

PHARMACOCINETIQUE DE L'ACIDE NIFLUMIQUE  
CHEZ LE CHEVAL

APPLICATION AU CONTROLE ANTI-DOPAGE  
ET A LA VISITE D'ACHAT

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE LYON

(MEDECINE - PHARMACIE)

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 2 Juillet 1980

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR-VETERINAIRE

PAR

PONCET Françoise épouse HACHLER

NÉE LE 16 Juillet 1955 A Chambéry









Digitized by the Internet Archive  
in 2026

**PHARMACOCINETIQUE DE L'ACIDE NIFLUMIQUE  
CHEZ LE CHEVAL**

**APPLICATION AU CONTROLE ANTI-DOPAGE  
ET A LA VISITE D'ACHAT**

**THESE**

**PRESENTEE**

**A L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE LYON**

**(MEDECINE - PHARMACIE)**

**ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 2 Juillet 1980**

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR-VETERINAIRE**

**PAR**

**PONCET Françoise épouse HACHLER**

**NÉE LE 16 Juillet 1955 A Chambéry**





PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON.

DIRECTEUR :

Monsieur le Professeur COTTEREAU

DIRECTEURS HONORAIRES :

Messieurs les Professeurs :

TAPERNOUX, FLORIO, FROGET.

PROFESSEURS :

|                                                                        |                 |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| - Alimentation .....                                                   | M. WOLTER       |
| - Anatomie .....                                                       | M. BARONE       |
| - Chirurgie .....                                                      | M. COULON       |
| - Histologie et Anatomie Pathologique .....                            | M. TISSEUR      |
| - Hygiène et Industrie des aliments d'origine animale ...              | M. CHANTEGRELET |
| - Maladies Contagieuses .....                                          | M. JOUBERT      |
| - Parasitologie .....                                                  | M. EUZEBY       |
| - Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie.....               | M. OUDAR        |
| - Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-<br>cour ..... | M. COTTEREAU    |
| - Pathologie médicale des Equidés et Carnivores .....                  | M. FONTAINE     |
| - Pathologie de la reproduction .....                                  | M. BERTRAND     |
| - Pharmacie-Toxicologie .....                                          | M. LORGUE       |
| - Physiologie - Thérapeutique .....                                    | M. BOST         |
| - Physique et Chimie biologiques et médicales .....                    | M. DELATOUR     |
| - Zootechnie .....                                                     | M. FROGET       |
| - C.F.T.S.V.....                                                       | M. FLACHAT      |

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. BOIVIN, DESCHANEL, GASTELJOU, JEAN-BLAIN, LAPRAS, Melle LAVAL,  
MM. LE NIIQUANNEN, PRAVE.



MAITRES DE CONFERENCES :

M. FRANCK.

MAITRES-ASSISTANTS AGREGES :

M. KECK.

MAITRES-ASSISTANTS :

M. BELLI, Mme CHAUVE, M. CHOMEL, Melle COURSAT, MM. DEMONT, DENOIX, EUZEBY,  
FAU, GARNIER, GEVREY, GOUY, JAUSSAUD, LEGEAY, NEYRET, Mme RACHAIL, M. RICHARD.

ASSISTANTS :

MM. BENOIT, BEZEAUD, Mme CHAPPUIS, M. CHARLET, Melle FAUBLEE, MM. FOURNEL,  
FRESNAY, GENIN, Mme HACHLER, MM. LEFOURNIER, MAY, NGO TAN, RAGUIN, THIEBAULT,  
THIEVENAZ.



## EXAMINATEURS DE LA THESE

PRESIDENT ..... M. Le Professeur BERTOYE,  
de la Faculté de Médecine LYON NORD.

PREMIER ASSESSEUR ..... M. Le Professeur LORGUE,  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire

DEUXIEME ASSESSEUR ..... M. Le Professeur DELATOUR,  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire.

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I, et L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE  
DE LYON déclarent que les opinions émises dans les dissertations qui  
leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs  
auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni impro-  
bation.



A Monsieur le Professeur BERTOYE

Professeur à la Faculté de Médecine de LYON

qui nous a fait le très grand honneur d'accepter la  
Présidence de notre Jury de thèse.

Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre  
reconnaissance et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur LORGUE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

qui nous a inspiré ce travail,

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre  
profonde gratitude pour l'accueil et les nombreux  
conseils qu'il nous a prodigués.

A Monsieur le Professeur DELATOUR

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de LYON

qui s'est penché sur notre travail et a accepté de  
le juger.

Nous souhaitons qu'il trouve ici l'expression de notre  
reconnaissance.



A Monsieur COURTOT,

Ingénieur I.N.R.A.,

dont la compétence nous a été d'un grand secours  
dans l'élaboration de ce travail.

Nous le remercions pour la grande disponibilité  
témoignée à notre égard et pour les encouragements  
qu'il nous a prodigués.

A Monsieur GUYOT,

Technicien supérieur,

qu'il soit ici remercié pour sa précieuse collaboration.

Aux membres du personnel du Laboratoire de Pharmacie-  
Toxicologie,

A chaque instant, ils nous ont témoigné une amitié qui  
nous a beaucoup aidée.



Nous tenons à remercier tout particulièrement les Laboratoires UPSA qui ont eu l'amabilité de nous fournir les échantillons d'acide niflumique et qui ont participé, grâce à leur aide financière, à la réalisation de ce travail.



A Mes Parents,

qui m'ont toujours encouragée dans la voie que j'ai  
choisie.

A BRUNO,

qui m'a toujours soutenue et aidée à franchir les  
obstacles.

A Ma Famille,

A Mes Amis.



## PLAN

### INTRODUCTION.

### I RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.

#### I.1 - Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

##### I.1.1. : Dérivés salicylés.

- I.1.1.1. : Acide salicylique,
- I.1.1.2. : Acide acétylsalicylique,
- I.1.1.3. : Acétylsalicylate de lysine,
- I.1.1.4. : Bénorilate,

##### I.1.2. : Dérivés anthraniliques et isostères.

- I.1.2.1. : Dérivés de l'acide anthranilique,
- I.1.2.2. : Isostères,

##### I.1.3. : Les pyrazolés.

- I.1.3.1. : Phénylbutazone,
- I.1.3.2. : Dérivés de la phénylbutazone,
  - I.1.3.2.1. : Associations moléculaires,
  - I.1.3.2.2. : Métabolites et leurs dérivés,
  - I.1.3.2.3. : Analogues par ouverture de cycle,
  - I.1.3.2.4. : Substitution sur l'hydrogène en 4.

##### I.1.4. : Dérivés de l'indole et isostères.

- I.1.4.1. : Dérivés de l'acide indol-acétique,
- I.1.4.2. : Isostères de l'acide indol-acétique.
  - I.1.4.2.1. : Benzydamine,
  - I.1.4.2.2. : Sulindac.

##### I.1.5. : Dérivés arylalcanoïques.

- I.1.5.1. : Acides arylacétiques.

- I.1.5.1.1. : Acides phénylacétiques,
- I.1.5.1.2. : Acides naphthalène acétiques,
- I.1.5.1.3. : Acides phénothiazine acétiques.

I.1.5.2. : Acides arylbutyriques,

I.1.6. : Enzymes anti-inflammatoires.

I.1.6.1. : Enzymes d'origine animale.

I.1.6.1.1. : Alphachymotrypsine,

I.1.6.1.2. : Hyaluronidase,

I.1.6.2. : Enzymes d'origine végétale,

I.1.6.3. : Enzymes d'origine bactérienne ou fongique.

## I.2. - Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

I.2.1. : Rappels physiopathologiques concernant l'inflammation.

I.2.1.1. : Phase silencieuse préparatoire,

I.2.1.2. : Phase vasculaire,

I.2.1.2.1. : Modifications morphologiques,

I.2.1.2.2. : Médiateurs de l'inflammation aiguë,

I.2.1.3. : Phases cellulaires et anaboliques,

I.2.1.4. : Schéma récapitulatif de la réaction inflammatoire.

I.2.2. : Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens,

I.2.2.1. : Inhibition de la synthèse des prostaglandines.

I.2.2.1.1. : Mise en évidence de cette inhibition.

I.2.2.1.2. : Explication de l'effet thérapeutique.

I.2.2.2. : Mécanisme de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines.

I.2.2.2.1. : Action anti-enzymatique,

I.2.2.2.2. : Etude de la relation structure-activité  
des acides N anthraniliques.

### I.3. - Présentation de l'acide niflumique.

#### I.3.1. : Données analytiques,

I.3.1.1. : Formule chimique,

I.3.1.2. : Caractères organoleptiques,

I.3.1.3. : Caractères physiques,

I.3.1.3.1. : Solubilité,

I.3.1.3.2. : Point de fusion,

I.3.1.3.3. : Spectre d'absorption dans l'ultra-violet.

#### I.3.2. : Propriétés pharmacologiques,

I.3.2.1. : Mise en évidence des propriétés anti-inflammatoires.

I.3.2.1.1. Méthodes utilisées,

I.3.2.1.1. Résultats.

I.3.2.2. : Autres propriétés de l'acide niflumique.

#### I.3.3. : Présentation commerciale,

I.3.3.1. : En médecine humaine,

I.3.3.1.1. : Formes commerciales,

I.3.3.1.2. : Indications,

I.3.3.1.3. : Posologie.

I.3.3.2. : En médecine vétérinaire,

I.3.3.2.1. : Félalgyl°,

I.3.3.2.2. : Sepvadol canin°

#### I.3.4. : Etude du métabolisme de l'acide niflumique dans différentes espèces.

I.3.4.1. : Etude pharmacocinétique,

I.3.4.2. : Biotransformations de l'acide niflumique,

I.3.4.3. : Voies métaboliques possibles pour l'acide niflumique.

## II PARTIE EXPERIMENTALE.

### II.1. - Méthode analytique.

II.1.1. : Dosage de l'acide niflumique libre dans le plasma.

II.1.1.1. : Extraction et dérivation.

II.1.1.1.1. : Réactifs,

II.1.1.1.2. : Matériel,

II.1.1.1.3. : Extraction,

II.1.1.1.4. : Dérivation.

II.1.1.2. : Dosage par chromatographie en phase gazeuse.

II.1.2.1.1. : Conditions chromatographiques,

II.1.2.1.2. : Calculs.

II.1.2. : Dosage de l'acide niflumique dans l'urine.

II.1.2.1. : Hydrolyse des urines.

II.1.2.1.2. : Réactifs,

II.1.2.1.2. : Matériel

II.1.2.1.3. : Méthode.

II.1.2.2. : Extraction.

II.1.2.2.1. : Réactifs,

II.1.2.2.1. : Matériel,

II.1.2.2.3. : Méthode,

II.1.2.3. : Purification.

II.1.2.3.1. : Réactifs,

II.1.2.3.2. : Matériel,

II.1.2.3.3. : Méthode.

II.1.3. : Dosage de l'acide niflumique dans les fèces.

II.1.3.1. : Extraction.

II.1.3.1.1. : Réactifs,

II.1.3.1.2. : Matériel,

II.1.3.1.3. : Méthode.

II.1.3.2. : Purification.

II.1.3.2.1. : Réactifs,

II.1.3.2.2. : Matériel,

II.1.3.2.3. : Méthode.

II.2. - Pharmacocinétique de l'acide niflumique chez le cheval.

II.2.1. : Protocole expérimental.

II.2.1.1. : Les animaux,

II.2.1.2. : Mode d'administration.

II.2.1.2.1. : Administration per os,

II.2.1.2.2. : Application de pommade.

II.2.1.3. : Prélèvements sanguins :

II.2.1.3.1. : Matériel,

II.2.1.3.2. : Temps de prélèvement.

II.2.1.4. : Prélèvements d'urine :

II.2.1.4.1. : Matériel,

II.2.1.4.2. : Temps de prélèvement.

II.2.1.5. : Prélèvements de fèces.

II.2.2. : Résultats.

II.2.2.1. : Administration répétée d'acide niflumique per os.

II.2.2.1.1. : Concentration plasmatique,

II.2.2.1.2. : Elimination urinaire,

II.2.2.1.3. : Elimination fécale.

II.2.2.2. : Application répétée d'acide niflumique en pommade.

II.2.3. : Discussion.

II.2.3.1. : Administration répétée per os.

II.2.3.1.1. : Concentration plasmatique,

II.2.3.1.2. : Elimination urinaire,

II.2.3.1.3. : Elimination fécale.

II.2.3.2. : Application répétée de pommade.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.



## INTRODUCTION

Pour combattre le processus inflammatoire, réaction normale de l'organisme à une agression, mais dont la durée ou l'intensité sont parfois préjudiciables à ce même organisme, il faut mettre en oeuvre un traitement approprié ; actuellement le thérapeute dispose de deux classes de médicaments anti-inflammatoires, les anti-inflammatoires glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens, objet de cet exposé.

Nous allons, dans une première partie, bibliographique, classer les principaux anti-inflammatoires non stéroïdiens et rappeler leur mode d'action avant d'envisager l'étude plus approfondie de l'acide niflumique, sujet de notre travail ; dans une deuxième partie, expérimentale, nous exposerons d'une part, la méthode analytique utilisée pour doser l'acide niflumique dans divers prélèvements, d'autre part les résultats obtenus à l'issue de l'étude pharmacocinétique réalisée chez le Cheval.

Le choix de ce modèle expérimental a été motivé par le fait que les anti-inflammatoires sont de plus en plus largement employés dans cette espèce. En effet, ces animaux sont soumis à des efforts violents, générateurs de traumatismes divers qui vont souvent se traduire par des boiteries que l'administration d'anti-inflammatoires pourra masquer. Pour cette raison, leur emploi est réglementé lors des manifestations hippiques : ils sont interdits dans les courses et les concours de dressage, autorisés sous certaines conditions dans les autres concours. Les anti-inflammatoires peuvent également être utilisés par des vendeurs de chevaux peu scrupuleux qui trompent un acheteur en lui proposant un cheval soit-disant exempt de boiteries. Pour lutter contre ces emplois frauduleux, il est nécessaire de connaître la pharmacocinétique de ces composés chez le Cheval. C'est donc sous l'aspect du contrôle anti-dopage que nous envisagerons l'étude pharmacocinétique de l'acide niflumique, médicament utilisé chez l'homme et dont l'emploi se développe chez le Cheval, en administration orale.



I. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.



## I. 1 - Classification des anti-inflammatoires non stéroïdiens (5, 16)

Il est difficile de reconnaître une unité de structure à tous les anti-inflammatoires non stéroïdiens; cependant, il faut noter qu'il s'agit, dans pratiquement tous les cas, d'acides ou de dérivés d'acides organiques. Nous distinguerons les dérivés salicylés, anthraniliques, pyrazolés, les dérivés de l'indole, les dérivés arylalcanoïques et les enzymes anti-inflammatoires.

### I.1.1. : Dérivés salicylés :

Cette classe est la plus anciennement utilisée ; l'acide salicylique, produit d'hydrolyse de la salicine, glucoside extrait de l'écorce de *Salix Alba*, est utilisé depuis 1875 dans le traitement du rhumatisme articulaire aigu.

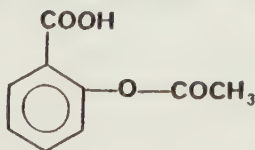
#### I.1.1.1. : Acide salicylique :

On le trouve dans les spécialités vétérinaires, sous forme de salicylate de sodium, en association avec de la phénylbutazone. Nous pouvons, par exemple, citer l'Eutherzone° ou le Butasyl°, spécialités présentées sous forme de soluté injectable.

L'acide salicylique est utilisé par ailleurs comme antiseptique externe, à action kératolytique.

#### I.1.1.2. : Acide acétylsalicylique : Aspirine :

Il est employé depuis 1899 en médecine humaine. Il s'agit, chimiquement de l'ester de l'acide acétique avec l'acide salicylique.



En médecine vétérinaire, on le trouve dans différentes spécialités comme l'Ucamix V Aspiri C°, prémélange contenant également de la vitamine C ou le Pyravio°, soluté buvable pour volaille, dans lequel l'acide acétylsalicylique est associé avec du chloramphénicol.

I.1.1.3. : Acétylsalicylate de lysine :

En médecine vétérinaire, ce sel, de nom déposé Vétalgine° est commercialisé uniquement sous forme injectable.

I.1.1.4. : Bénorilate (Bénortan°) :

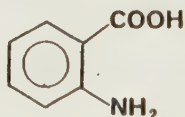
C'est l'ester de l'acide acétylsalicylique et du paracétamol, médicament doué lui-même de propriétés analgésiques et antipyrétiques.

I.1.2. : Dérivés anthraniliques et isostères :

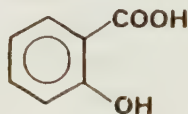
Deux corps isostères possèdent le même arrangement électronique ; cette particularité entraîne des similitudes au niveau des propriétés physiques.

I.1.2.1. : Dérivés de l'acide anthranilique :

L'acide anthranilique, ou acide ortho-amino-benzofique, possède une analogie structurale avec l'acide salicylique :

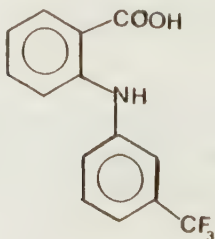


acide anthranilique

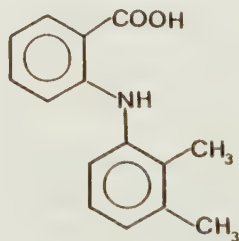


acide salicylique

Cette famille comporte 2 principaux dérivés, commercialisés uniquement en médecine humaine : l'acide flufénamique (Arlef°) et l'acide méfénamique (Ponstyl°).  
médicament essentiellement antalgique.



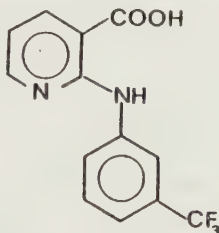
acide flufénamique.



acide méfénamique.

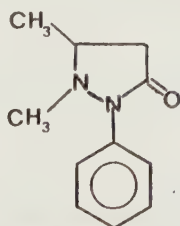
### I.1.2.2. : Isostères :

Un seul dérivé de cette classe est intéressant, l'acide niflumique (Nifluril°, Félalgyll°, Sepvadol Canin°) ; dans cette molécule le noyau phényl a été remplacé par le noyau pyridyl.



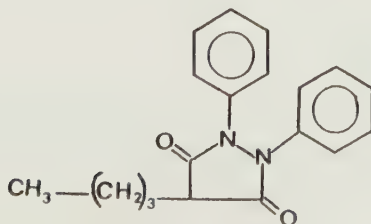
### I.1.3. : Les dérivés pyrazolés :

Nous retrouvons dans les composés de cette famille le noyau pyrazole.



#### I.1.3.1. : Phénylbutazone :

Introduite en thérapeutique en association avec l'amidopyrine, médicament analgésique, afin de solubiliser ce dernier, on s'aperçut que ses propriétés anti-inflammatoires étaient supérieures à celle de l'aspirine.



La phénylbutazone, très employée en médecine vétérinaire, est utilisée sous forme libre ou sous forme de sels ; nous regroupons dans le tableau I, à titre d'exemple, quelques spécialités vétérinaires contenant de la phénylbutazone.

| Nom de Spécialité       | Forme    | Principes actifs associés  | Voie d'administration               | Espèces animales          |
|-------------------------|----------|----------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Algonolone°             | libre    | Prednisolone               | Solution injectable IV, IM profonde | bovins, équins<br>porcins |
| Butasy1°                | libre    | Salicylate de sodium       | Solution injectable IV, IM profonde | bovins, équins            |
| Technalgine percutanée° | libre    | DMSO dans l'excipient      | per cutanée                         | toutes espèces            |
| Eutherzone              | Sodique  | Salicylate de sodium       | Solution injectable IV, IM profonde | bovins, équins            |
| Phénylarthrite crème °  | sodique  | Lignocaïne<br>DMSO         | per cutanée                         | toutes espèces            |
| Phénylarthrite bolus°   | calcique | néant                      | per os                              | bovins, équins<br>porcins |
| Arthri-dog°             | calcique | Prednisolone<br>Vitamine C | per os                              | chiens                    |

Tableau I : Spécialités vétérinaires contenant de la phénylbutazone.

(liste non exhaustive).

Nous constatons que la phénylbutazone est un médicament employé dans de nombreuses espèces animales domestiques, administrable par les voies locales, orales, parentérales.

#### I.1.3.2. : Dérivés de la phénylbutazone :

Ils sont nombreux, mais ils ne sont commercialisés que dans des spécialités humaines ; citons les principaux, prescrits quelques fois en médecine canine.

##### I.1.3.2.1. : Associations moléculaires :

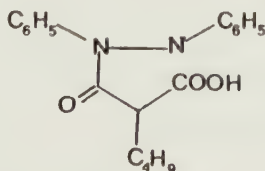
Il s'agit de combinaisons équimoléculaires de la phénylbutazone avec des molécules basiques ;

- combinaison avec la pipérazine : pyrazinobutazone (Carudol°),
- combinaison avec le cloféxamide : clofézone (Perclusone°),

##### I.1.3.2.2. : Métabolites et leurs dérivés :

Le plus important est l'oxyphenbutazone (Tandéril°), dérivé d'hydroxylation, moins toxique que la phénylbutazone pour la muqueuse gastrique.

##### I.1.3.2.3. : Analogues par ouverture de cycle :



Bumadizone commercialisée sous forme de sel calcique (Eumotol°)

##### I.3.2.4. : Substitution de l'hydrogène en 4 :

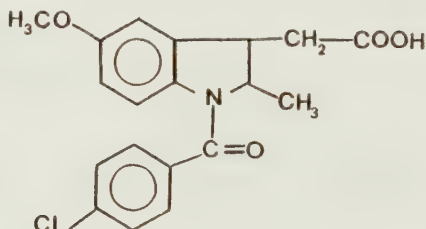
Les deux principaux médicaments de cette classe sont la pipébuzone (Elarzone°) et la suxibuzone (Calibène°). En médecine vétérinaire, la phénylbutazone, dérivé le plus ancien est le plus intéressant ; sa demi-vie, de 72 heures chez l'homme, est de seulement

six heures chez le chien et chez le cheval (32) ; cette propriété contribue à diminuer l'effet cumulatif de la phénylbutazone, observé chez l'homme.

#### I.1.4. : Dérivés de l'Indole et isostères :

##### I.1.4.1. : Dérivés de l'acide indol-acétique :

Un seul médicament de ce groupe est utilisé couramment, c'est l'indométhacine (Indocid°).



L'indométhacine est un anti-inflammatoire très puissant, doué également de propriétés analgésiques et antipyrétiques. Mais son emploi chez le chien a montré que, dans cette espèce, il était plus ulcérigène que l'aspirine (29).

##### I.1.4.2. : Isostères de l'acide indol-acétique :

I.1.4.2.1. : Benzydamine (Impryl°) : elle est utilisée en médecine vétérinaire notamment dans le traitement des métrites des bovins (27) et dans les affections bronchiques des poussins (24).

I.1.4.2.2. : Sulindac (Arthrocline°) : Son activité est légèrement inférieure à celle de l'indométhacine, mais sa durée d'action est supérieure ; cependant sa toxicité rénale chez le chien est élevée (36).

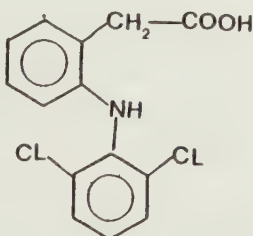
#### I.1.5. : Dérivés arylalcanoïques :

Cette classe compte de nombreux dérivés, difficiles à classer, appartenant à plusieurs séries chimiques ; ils ne sont commercialisés qu'en médecine humaine.

### I.1.5.1. : Acides arylacétiques :

#### I.1.5.1.1. : Acides phénylacétiques :

- ibuprofen (Brufen<sup>o</sup>) : son métabolisme lent chez le chien induit le risque d'accumulation (22),
- kétoprofène (Profenid<sup>o</sup>),
- diclofénac (Voltarène<sup>o</sup>) : il peut être considéré comme un homologue supérieur des acides N-anthraniliques; sa structure est à rapprocher de celle de l'acide niflumique.

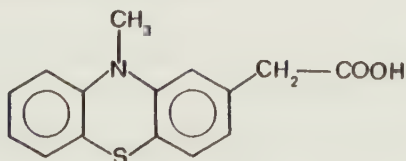


- alclofénac : ce dérivé, soumis actuellement à des essais cliniques, serait très intéressant chez le chien ; son action anti-inflammatoire est équivalente à celle de la phénylbutazone (36).

I.1.5.1.2. : Acides naphthalène acétiques : naproxen , efficace surtout dans les inflammations aiguës, mais sa toxicité gastro-intestinale contre-indique son emploi chez le chien (36).

#### I.1.5.1.3. : Acides phénothiaziné acétiques :

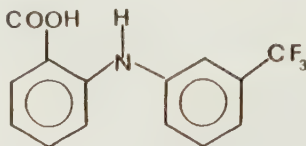
- acide métiazinique (Soripal<sup>o</sup>)



- acide protizinique (Pirocid<sup>o</sup>).

Ces deux médicaments sont utilisés en médecine humaine, en administration orale; ils sont expérimentalement actifs par voie parentérale.

On retrouve, par ouverture du cycle, une structure identique à celle de l'acide flufénamique.



Acide flufénamique

I.1.5.2. : Acides arylbutyriques :

Seul l'acide bucloxiq (Esfar<sup>o</sup>) est utilisé uniquement en médecine humaine.

I.1.6. : Enzymes anti-inflammatoires :

Elles constituent une classe bien distincte et sont utilisées pour traiter les inflammations localisées, en traumatologie ou lors d'états inflammatoires post-chirurgicaux. Ces enzymes protéolytiques sont actives sur la phase inflammatoire précoce.

I.1.6.1. : Enzymes d'origine animale :

I.1.6.1.1. : alphachymotrypsine (Alphachymotrypsine) : elle est administrée par voie locale, sous forme de pommade, par voie orale sous forme de comprimés, par voie parentérale, sous forme de solutés injectables.

I.1.6.1.2. : hyaluronidase (Healonid Vet<sup>o</sup>) : elle est indiquée en injection intraarticulaire, lors d'arthrite traumatique.

I.1.6.2. : Enzymes d'origine végétale :

Les plus utilisées sont la bromélaïne (Vextranase) et la papaïne.

I.1.6.3. : Enzymes d'origine bactérienne ou fongique :

Nous pouvons citer la streptokinase et l'alpha-amylase.

De cette classification, ont été écartés la colchicine, anti-inflammatoire spécifique de la goutte, ainsi que les médicaments utilisés dans les traitements antirhumatismaux tels les sels d'or, la D-pénicillamine, la lévamisole, les antipaludéens de synthèse.

Au terme de cette classification, nous pouvons distinguer trois groupes d'anti-inflammatoires non stéroïdiens :

- les anti-inflammatoires "majeurs" plus fréquemment utilisés ; ce sont les salicylés, les pyrazolés, l'indométhacine,

- les anti-inflammatoires de "seconde génération" ; ce sont les dérivés de l'acide anthranilique et les dérivés arylalcanoïques,

- les anti-inflammatoires "mineurs", d'indication plus restreinte, parmi lesquels nous pouvons citer les enzymes protéolytiques.

La diversité chimique de ces composés peut s'expliquer par leur action différentielle sur les quatre phases de l'inflammation que nous allons essayer de schématiser maintenant.

## I.2. : Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

Après un bref rappel concernant le processus inflammatoire et plus particulièrement les médiateurs de l'inflammation aiguë, nous aborderons l'étude du mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.

### I.2.1. : Rappels physiopathologiques concernant l'inflammation :

L'inflammation se définit comme la réponse tissulaire à une agression d'origine très diverse : physique, chimique, traumatique, microbienne ou immunologique. Il s'agit d'un phénomène complexe et polymorphe dans lequel on distingue une phase vasculaire, précoce, puis une phase cellulaire et, enfin, une phase anabolique. Ces modifications peuvent varier quantitativement suivant l'agent agresseur, donnant naissance à des modalités particulières : les inflammations à réaction vasculaire prédominante, d'évolution en général rapide, constituent les inflammations aiguës, les inflammations à réaction cellulaire prédominante constituant les inflammations subaiguës et les inflammations caractérisées par une production de tissu conjonctif, les inflammations chroniques.

#### I.2.1.1. : Phase silencieuse préparatoire :

L'agression tissulaire, qui détermine parfois des lésions importantes, comme lors de traumatismes, va induire des modifications biochimiques; des médiateurs phlogogènes sont libérés et vont être à l'origine des modifications morphologiques.

#### I.2.1.2. : Phase vasculaire :

##### I.2.1.2.1. : modifications morphologiques (11) :

Cette phase comporte une vasodilatation des artérioles et veinules, complétée éventuellement par une congestion passive plus tardive, un oedème dû à l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

Certains constituants plasmatiques passent à travers la paroi vasculaire tels des protéines (albumine, fibrinogène, globuline), de l'eau, des sels minéraux, des globules rouges et des leucocytes.

Cette phase comporte donc trois phénomènes principaux, congestion, exsudation et diapédèse, caractéristiques de l'inflammation aiguë décrite par CELSUS deux siècles avant Jésus-Christ : "Notae vero inflammationis sunt quatuor : rubor et tumor cum calore et dolore."

I.2.1.2.2. : Médiateurs de l'inflammation aiguë (17, 35) :

Un médiateur est une substance responsable de l'induction des réactions vasculaires de l'inflammation.

a) Notion de médiateur (30) : un médiateur doit répondre à plusieurs critères énumérés ci-dessous :

- il doit reproduire, à faible dose, un ou plusieurs symptômes de l'inflammation,
- ses précurseurs, les enzymes nécessaires à sa synthèse, ou la substance elle-même doivent être identifiés localement,
- il doit être libéré localement à une concentration suffisante pour exercer son action pro-inflammatoire,
- ses antagonistes spécifiques, s'ils sont connus, doivent exercer sur certains tests, une activité anti-inflammatoire.

Cette définition très large, doit être limitée aux médiateurs terminaux de l'inflammation ; parmi les médiateurs, on compte des substances d'origine plasmatique, (les kinines et les produits du complément) et d'origine tissulaire, (l'histamine, la sérotonine et les prostaglandines).

b) Les amines vaso-actives ; histamine et sérotonine. Elles provoquent des phénomènes vasculaires aigus immédiats et transitoires en agissant surtout sur les veinules dépourvues de fibres lisses. La majeure partie de l'histamine provient des mastocytes et des polynucléaires basophiles ; son intervention semble se limiter à des réactions inflammatoires de type anaphylactique ; elle est également responsable de prurit par action directe sur les terminaisons nerveuses.

La sérotonine est libérée principalement à partir des plaquettes sanguines ; son action se limiterait à des phénomènes vasculaires spécifiques, comme certaines

migraines ; elle provoque de la douleur au niveau du foyer inflammatoire par action directe sur les terminaisons nerveuses.

#### c) Les peptides vasoactifs :

- Les kinines plasmatiques sont des polypeptides, dont le plus connu est la bradykinine, substance à 9 acides aminés, libérés à partir de kininogènes ; les kininogènes sont des protéines plasmatiques dont deux ont été identifiées, une de poids moléculaire élevé et une de poids moléculaire réduit. La libération des kinines se fait grâce à l'activation de kininogénases, enzymes protéolytiques présentes dans le plasma et certains tissus ; dans le plasma, les kininogénases se trouvent sous forme de prékininogénases dont l'activation résulte de l'action du facteur de Hageman activé.

L'interprétation du mécanisme d'action des kinines est délicate, et d'autant plus difficile qu'il n'existe pas d'inhibiteur spécifique de leur action in vivo ; la bradykinine est active surtout comme bronchoconstricteur et hypotenseur tandis que la kallidine, kinine à 10 acides aminés, agit plutôt sur la perméabilité vasculaire. Les kinines augmenteraient les effets d'autres médiateurs et même provoqueraient leur libération ; ainsi la bradykinine stimule la libération de prostaglandines dans les poumons.

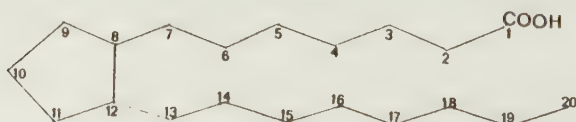
- Les produits du complément : les facteurs C2b et C4a du complément sont des peptides libérés des facteurs C2 et C4, lors de la réaction d'activation du complément. Ils exercent la même action que les kinines.

#### d) Les prostaglandines :

Nous envisagerons successivement leur classification, leur synthèse et leur rôle dans l'inflammation.

##### - définition et classification :

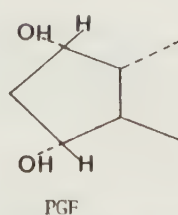
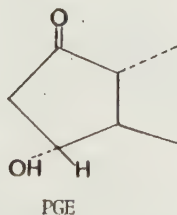
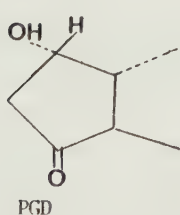
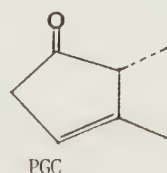
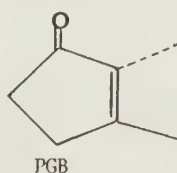
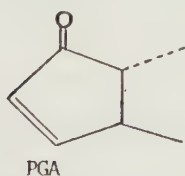
Ce sont des substances lipidiques, à 20 atomes de carbone, présentant un squelette prostanoïque, squelette d'acide gras insaturé et oxygéné comprenant 2 chaînes latérales fixées sur un noyau pentagonal.



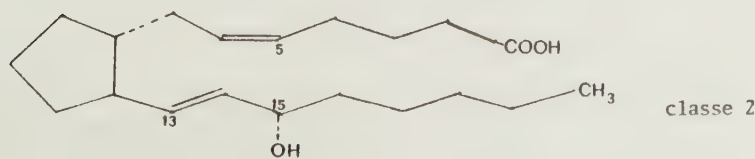
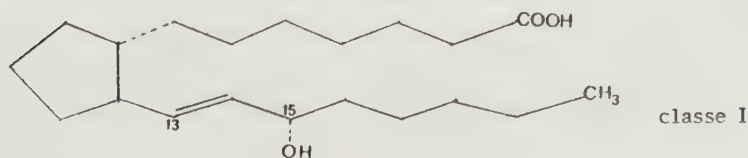
A l'état naturel, il n'existe que les formes alpha, c'est-à-dire que la chaîne portant la fonction acide est en arrière du plan de la formule. Certains éléments se retrouvent de façon constante, dans la structure générale des prostaglandines :

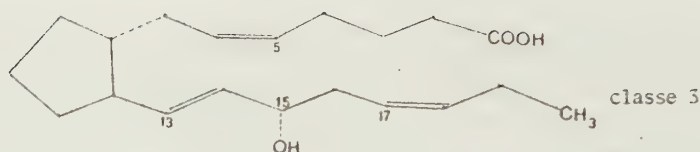
- une double liaison I3-I4,
- une fonction hydroxyle en C<sub>I5</sub>,
- une fonction oxygénée, cétone ou alcool secondaire, en C<sub>9</sub>,
- plusieurs carbones asymétriques en particulier en C<sub>8</sub>, C<sub>I2</sub>, C<sub>I5</sub>.

La classification des prostaglandines est basée sur deux critères, l'état de substitution du cycle pentagonal et le degré d'insaturation des chaînes latérales. L'état de substitution du cycle pentagonal permet de définir un certain nombre de groupes, dont nous allons citer les six principaux :

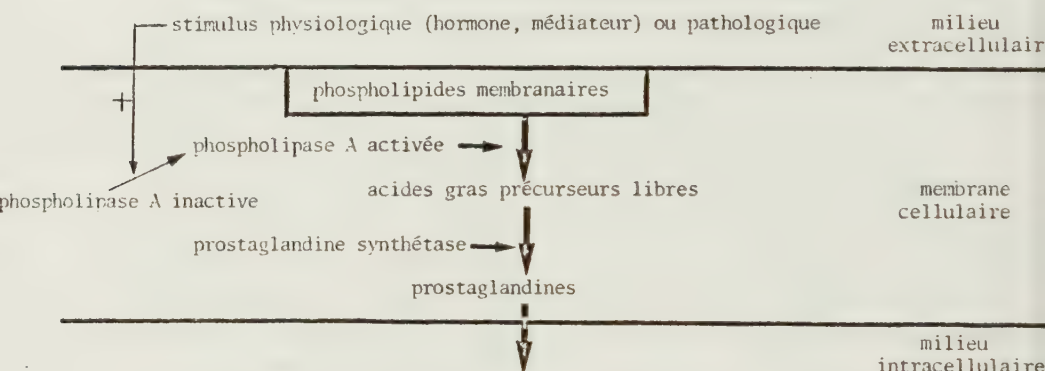


Dans chaque groupe, on définit, suivant le degré d'insaturation des chaînes latérales, 3 classes :





- synthèse des prostaglandines.: elle a lieu au niveau de la membrane cellulaire, dans un grand nombre de tissus, comme le montre le schéma suivant :



La classe de la prostaglandine synthétisée varie en fonction de l'acide gras précurseur; nous allons donner l'exemple de la synthèse des PG 2 dont l'acide gras précurseur est l'acide 5-8-11-14 eicosatétranoïque ou acide arachidonique.

- rôles des prostaglandines dans l'inflammation; on retrouve  $PGE_2$  et  $PGF_2$  dans les foyers inflammatoires, en particulier dans de nombreux liquides et exsudats inflammatoires de toutes origines comme les liquides synoviaux de polyarthrite rhumatoïde.

Elles provoquent un érythème marqué chez l'homme et libèrent l'histamine des mastocytes de rat.

Elles augmentent la perméabilité membranaire après injection intraveineuse (1) ou intradermique (18) en agissant soit directement sur la paroi vasculaire, soit par libération d'histamine (20).

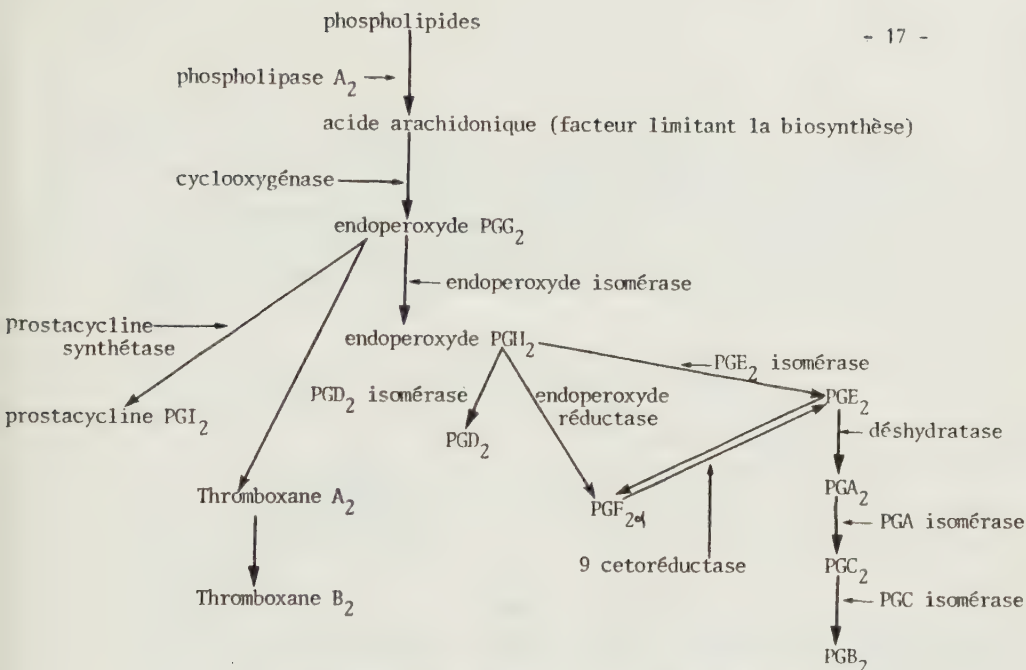


Schéma du métabolisme de l'acide arachidonique.

Elles facilitent la migration leucocytaire vers le foyer inflammatoire et jouent un rôle dans la phagocytose elle-même.

Les prostaglandines paraissent agir comme des régulateurs de l'inflammation ; on considère cependant qu'il existe une potentialisation entre bradykinine et prostaglandines, potentialisation que l'on retrouve dans l'action sur la douleur (9).

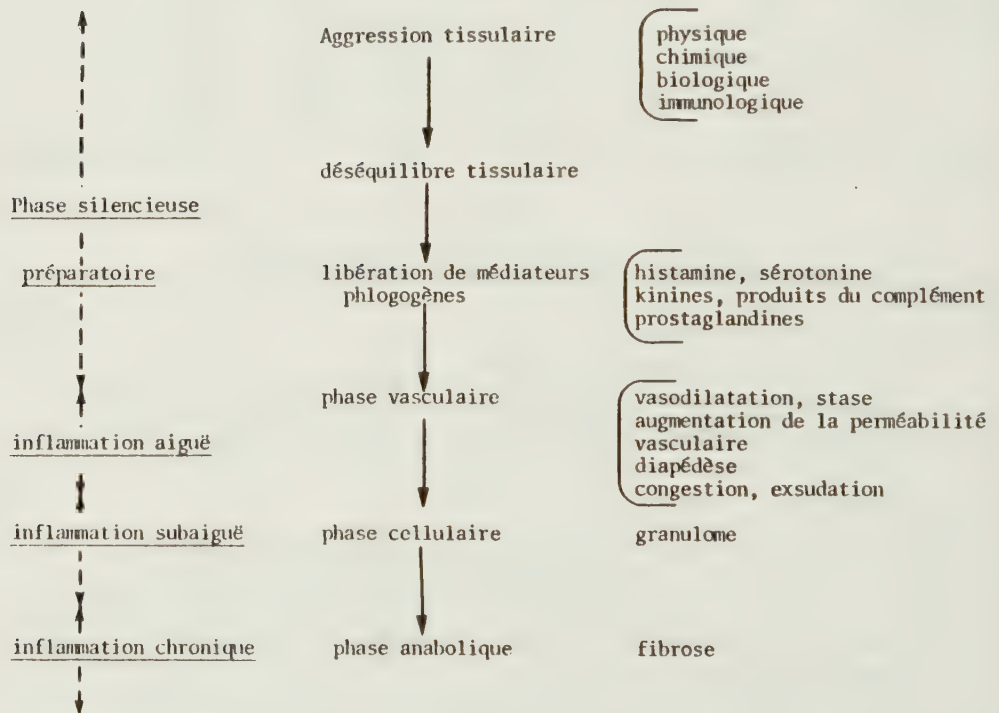
#### 1.2.1.3. : Phases cellulaires et anaboliques (II) :

Ces phases comportent au niveau du foyer inflammatoire un afflux de différents types cellulaires; ces cellules nouvelles proviennent du sang (polynucléaires, monocytes, lymphocytes) et du tissu conjonctif voisin (fibroblastes, histiocytes essentiellement). Ces cellules vont se multiplier, se métamorphoser, donnant naissance à des macrophages qui viennent débarrasser le foyer inflammatoire des débris cellulaires ; elles vont remplacer les pertes tissulaires en constituant des granulomes ; dans la plupart des cas la guérison survient à ce stade.

Les granulomes contiennent également des fibroblastes, qui vont élaborer du collagène ; si cette production devient importante, le collagène va former une coque entourant le granulome ; il y a passage à la chronicité.

Le mécanisme du passage d'une inflammation aiguë à la chronicité est mal élucidé encore, mais il semble que les macrophages jouent un rôle dans ce phénomène (25).

#### I.2.1.4. : Schéma récapitulatif de la réaction inflammatoire :



Ces notions concernant les mécanismes de l'inflammation et en particulier le rôle des divers médiateurs nous permettent d'aborder l'étude des mécanismes d'action des anti-inflammatoires.

## I.2.2. : Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens :

Ces anti-inflammatoires ont plusieurs points d'impact sur le mécanisme inflammatoire ; cependant la plupart d'entre eux possèdent en commun la propriété d'inhiber la synthèse des prostaglandines, propriété que nous allons étudier maintenant.

### I.2.2.1. : Inhibition de la synthèse des prostaglandines :

#### I.2.2.1.1. : mise en évidence :

Les prostaglandines sont, nous l'avons vu précédemment des médiateurs de l'inflammation aiguë; pour expliquer le mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens, les recherches se sont donc orientées vers une possible action de ces substances sur la synthèse des prostaglandines.

VANE (33) a tout d'abord mis en évidence in vitro, que dans l'ordre décroissant d'activité, l'indométhacine, l'aspirine et les salicylates inhibent la synthèse de  $PGE_2$  et de  $PGF_{2\alpha}$  à partir d'acide arachidonique; il a utilisé pour montrer cette action, le système de prostaglandines synthétases isolé à partir d'une préparation acellulaire de poumon de cobaye. Ensuite, FLOWER et coll. (12) ont étendu leurs observations en étudiant l'action d'autres anti-inflammatoires sur des systèmes enzymatiques différents ; ils ont en particulier effectué une expérimentation sur les prostaglandines synthétases provenant de la rate de chiens ; plusieurs anti-inflammatoires ont été testés vis-à-vis de ce système, à différentes concentrations ; ainsi une dose inhibitrice 50 (ID 50) a été définie pour chaque anti-inflammatoire testé.

| Anti-inflammatoires | ID 50<br>mcg/ml | pic sanguin chez<br>l'homme mcg/ml | Liaison aux protéines<br>plasmatiques<br>en p. cent | ED 50 <sup>1</sup> sur l'œdème à la carragénine de la<br>patte de rat<br>mg/kg |
|---------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| acide niflurique    | 0,03            | 69-103                             | 82-98                                               | 47                                                                             |
| indométhacine       | 0,06            | 1,8                                | 90                                                  | 6,5                                                                            |
| phénylbutazone      | 2,23            | 60-150                             | 98                                                  | 100                                                                            |
| aspirine            | 6,61            | 30-55                              | 50-80                                               | 150                                                                            |

<sup>1</sup> : ED50 : dose efficace 50

Un produit est inactif vis-à-vis de la synthèse des prostaglandines quand aucune inhibition n'a été observée à 100 mcg/ml.

Les anti-inflammatoires stéroïdiens testés comme la dexaméthasone et la triamcinolone ont peu ou pas d'action inhibitrice; il en est de même pour les analogues de l'aspirine, qui n'ont pas d'action anti-inflammatoire comme les acides para et ortho-hydroxybenzoïques.

#### 1.2.2.1.2. : Explication de l'effet thérapeutique :

VANE a été le premier à émettre l'hypothèse que l'effet thérapeutique des anti-inflammatoires non stéroïdiens s'expliquait par l'inhibition de la synthèse des prostaglandines; nous allons maintenant énoncer les principaux faits corroborant cette hypothèse :

- les prostaglandines E ont été les médiateurs de l'inflammation les plus étudiés ; elles provoquent un oedème durable et exacerbent l'oedème et la douleur provoqués par d'autres médiateurs comme la bradykinine et l'histamine.
- tous les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la synthèse des prostaglandines sauf l'or, la D pénicillanine et la colchicine (13).
- les ID 50 sont inférieures aux pics plasmatiques mesurés après une administration thérapeutique, même en tenant compte de la liaison avec les protéines plasmatiques,
- il existe une corrélation entre l'inhibition de la synthèse des prostaglandines et l'activité anti-inflammatoire ; ainsi, pour une ID 50 inférieure, l'action anti-inflammatoire mesurée par le test de l'oedème à la carragénine sur la patte de rat sera supérieure (Tableau II ), sauf pour l'indométhacine,
- les doses thérapeutiques des anti-inflammatoires non stéroïdiens réduisent la synthèse des prostaglandines chez l'homme,

Ainsi VANE (34) affirme que lorsqu'un important groupe de substances chimiques diverses, ayant en commun un effet anti-inflammatoire partage l'unique propriété d'inhiber la synthèse de substances proinflammatoires, la seule théorie acceptable est que cette inhibition est à la base de l'effet thérapeutique ; cependant, certains anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent avoir d'autres actions : les fénamates, par exemple, bloquent les récepteurs des prostaglandines (8).

Cette théorie a cependant des détracteurs; ainsi M.J.H. SMITH affirme que les anti-inflammatoires non stéroïdiens agissent à différents niveaux de l'inflammation aiguë et chronique, l'action sur la synthèse des prostaglandines n'étant qu'un des mécanismes mis en jeu (31).

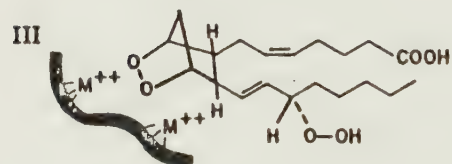
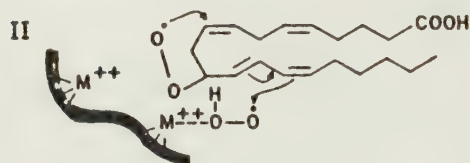
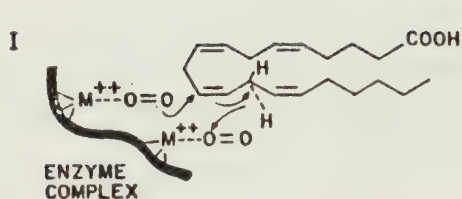
Malgré ses détracteurs, l'inhibition de la synthèse des prostaglandines semble être le mode d'action principal des anti-inflammatoires non stéroïdiens ; nous allons maintenant envisager le mécanisme de cette inhibition.

#### I.2.2.2. : Mécanisme de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines :

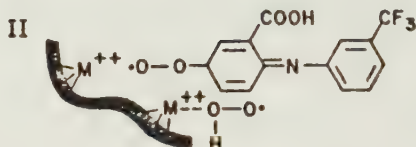
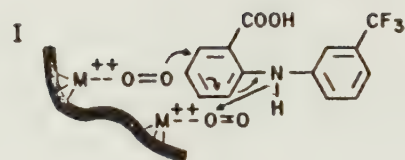
##### I.2.2.2.1. : action anti-enzymatique :

FLOWER (13) a montré que les anti-inflammatoires non stéroïdiens agissent en inhibant la cyclooxygénase, enzyme qui transforme l'acide arachidonique en endoperoxyde. Les modalités de cette action anti-enzymatique diffèrent suivant les substances anti-inflammatoires. D.W. CUSIMAN et H.S. CHUNG (10) ont étudié l'inhibition de la synthèse des prostaglandines in vitro à deux concentrations différentes d'acide arachidonique, une faible (1mM) et une forte (1 mM). Ils ont utilisé une préparation microsomale de vésicule séminale de taureau, qui est capable de synthétiser à partir d'acide arachidonique  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGD}_2$ . La benzyldamine n'entre pas ou peu, en compétition avec l'acide arachidonique et, à forte concentration en acide arachidonique, elle augmente la synthèse de  $\text{PGE}_2$ , tout en inhibant celles de  $\text{PGD}_2$  et de  $\text{PGF}_2$ . L'acide niflumique par contre, est un inhibiteur compétitif, agissant de manière équivalente sur la synthèse des trois prostaglandines ; les acides fénamiques, l'indométhacine, la phénylbutazone et l'aspirine n'entrent que partiellement en compétition avec le substrat, tout en inhibant également la synthèse des trois prostaglandines.

Ces deux auteurs ont proposé un modèle hypothétique de l'interaction compétitive des acides fénamiques avec l'acide arachidonique que nous rapportons dans le tableau III.



ARACHIDONATE  
OXYGENATION



III  
PEROXIDATIVE ATTACK ON THE  
ENZYME

COMPETITIVE INHIBITION +  
IRREVERSIBLE INACTIVATION

Tableau III : Modèle hypothétique de l'interaction compétitive des acides fénamiques avec l'acide arachidonique sur le site actif de la cyclooxygénase (10).

#### I.2.2.2.2. : Etude de la relation structure-activité des acides N-anthraniliques :

Cette étude a été menée également par D.W. CUSIMAN et H.S. CHEUNG (10). Ils ont montré que le noyau diphenylamine était nécessaire et suffisant pour exercer l'inhibition compétitive. Le groupement O-carboxylique est responsable d'une augmentation de l'action inhibitrice. Les composés les plus actifs présentent une fonction O-carboxylique sur un noyau et une substitution m-alkyl sur l'autre ; par contre, un deuxième groupement O-carboxylique sur le noyau opposé détruit l'activité inhibitrice.

Nous avons tenté d'analyser le mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Les stéroïdiens interviennent également dans la biosynthèse des prostaglandines, mais à un autre niveau ; ils empêchent la libération, à

partir des phospholipides de la membrane cellulaire, des acides gras indispensables à la biosynthèse des prostaglandines, en bloquant l'activité phospholipase  $A_2$  (19, 23).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens agissent à d'autres stades du processus inflammatoire; par exemple, au niveau de la phase silencieuse initiale, la plupart d'entre eux inactivent le phosphate de pyridoxal, coenzyme nécessaire à la formation d'histamine, de sérotonine, des kinines et de certaines protéases. Dans la phase vasculaire, ils agissent comme stabilisant de membranes, diminuant en particulier la libération de sérotonine de plaquettes. Dans la phase anabolique, ils s'opposent à la prolifération conjonctive et à la formation des granulomes. Les salicylés, l'indométhacine, les dérivés anthraniliques interviennent sur les différentes phases, alors que les pyrazolés agissent uniquement sur les phénomènes vasculaires précoces.

Nous allons maintenant nous intéresser à un de ces anti-inflammatoires, l'acide niflumique, médicament encore peu utilisé en médecine vétérinaire.

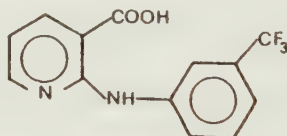
### I.3. - Présentation de l'acide niflumique :

Nous allons, dans ce chapitre, développer après quelques données analytiques, les propriétés pharmacologiques et le métabolisme de l'acide niflumique, anti-inflammatoire non stéroïdien, dérivé de l'acide anthranilique.

#### I.3.1. : Données analytiques :

##### I.3.1.1. : Formule chimique :

C'est l'acide trifluorométhyl-3-phénylamino-2-nicotinique, répondant à la formule  $C_{13}H_9F_3N_2O_2$ , de poids moléculaire égal à 282I; sa formule développée est la suivante :



##### I.3.1.2. : Caractères organoleptiques :

Le principe actif se présente sous forme de poudre microcristalline, jaune pâle, inodore.

##### I.3.1.3. : Caractères physiques :

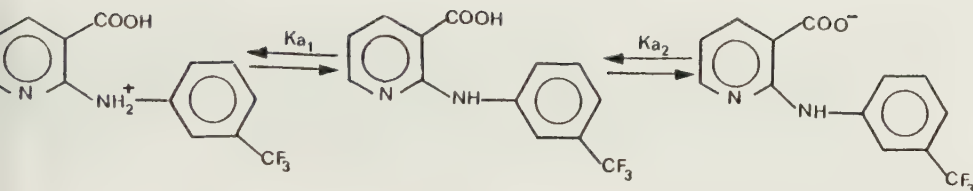
###### I.3.1.3.1. : Solubilité :

Dans les solutions aqueuses, elle est fonction du pH du milieu ; le calcul du pKa de l'acide niflumique donne 2 valeurs (6) :

$$pka_1 = 2,10 \pm 0,05$$

$$pka_2 = 5,00 \pm 0,05$$

$pka_1$  pourrait correspondre à la protonisation de la fonction amine secondaire  
 $pka_2$  correspondant à l'ionisation de la fonction acide carboxylique :



La solubilité de l'acide niflumique est minimale à pH 3,6 ; elle augmente pour des pH plus élevés (solution diluée de soude) ou plus faibles ; par ailleurs, l'acide niflumique est soluble dans l'éther, peu soluble dans le méthanol et dans l'éthanol.

I.3.1.3.2. : Point de fusion : 204°C.

I.3.1.3.3. : Spectre d'absorption dans l'ultra-violet : Une solution d'acide niflumique à 10mcg/ml, de pH 12, passée au spectrophotomètre donne un spectre présentant un maximum à 286 nm, un épaulement vers 330 nm, un minimum à 243 nm.

### I.3.2. Propriétés pharmacologiques :

#### I.3.2.1. : Mise en évidence des propriétés anti-inflammatoires :

BOISSIER et coll. (2), après avoir remplacé le noyau phényl des acides méfénamique et flufénamique par un noyau pyridyl, ont étudié les propriétés anti-inflammatoires des composés ainsi synthétisés. Nous nous bornerons à rappeler les résultats obtenus avec l'acide niflumique.

##### I.3.2.1.1. Méthodes utilisées :

- oedème plantaire de la patte de rat : les rats reçoivent sous l'aponévrose plantaire superficielle 0,10 ml de différentes solutions ou suspension; dextran (6 p100), kaolin (10 p 100), carragénine (2p100)

- pellets à la carragénine : un disque de papier imprégné de carragénine à I p. 100 est inséré sous la peau de l'abdomen; au bout de 8 jours, après sacrifice des rats, les granulomes formés autour du pellet sont prélevés ; l'acide niflumique est administré pendant les 8 jours de l'essai.

- pleurésies : l'acide niflumique est administré 30 minutes avant injection dans la cavité pleurale des rats de solutions soit de nitrate d'argent soit de bleu Evans ; au bout de 7 heures, l'exsudat formé est mesuré.

- péritonites : suivant un protocole identique à celui utilisé pour les pleurésies, des injections intra-péritonéales de formol à I p. 100 ou de liquide de Ringer sont effectuées.

#### I.3.2.1.2. : Résultats :

- pellets à la carragénine : la formation du néo-tissu granulomateux est diminué ; après administration de 25 mg/kg/j d'acide niflumique, le pourcentage d'inhibition est de 33 p. 100.

- oedèmes sous-placentaires : le tableau IV donne le pourcentage d'augmentation du volume de la patte observé avec les différentes solutions, en fonction du temps et de la dose d'acide niflumique administrée.

| Substance provoquant l'oedème | Doses per os mg/kg |     | pourcentage d'augmentation du volume de la patte après |      |    |     |     |      | Comparaison avec l'activité de l'aspirine       |
|-------------------------------|--------------------|-----|--------------------------------------------------------|------|----|-----|-----|------|-------------------------------------------------|
|                               |                    |     | I h                                                    | 1h30 | 2h | 3h  | 4 h | 24 h |                                                 |
| oedème ou dextran             | témoins            |     |                                                        | 87   | 84 |     |     | II   | Action modérée comparable à celle de l'aspirine |
|                               | rats traités       | 50  |                                                        | 65   | 62 |     |     | 7    |                                                 |
|                               |                    | 100 |                                                        | 52   | 49 |     |     | II   |                                                 |
|                               |                    | 200 |                                                        | 53   | 40 |     |     | 6    |                                                 |
| oedème ou kaolin              | témoins            |     | 62                                                     |      | 69 |     | 83  | 48   | Inhibition supérieure à celle de l'aspirine     |
|                               | rats traités       | 25  | 43                                                     |      | 40 |     | 40  | 47   |                                                 |
|                               |                    | 50  | 47                                                     |      | 50 |     | 50  | 60   |                                                 |
|                               |                    | 100 | 31                                                     |      | 24 |     | 20  | 38   |                                                 |
|                               |                    | 200 | 30                                                     |      | 37 |     | 40  | 40   |                                                 |
| oedème à la carragénine       | Témoins            |     |                                                        | 100  |    | 107 |     |      | Inhibition peu intense                          |
|                               | rats traités       | 100 |                                                        | 72   |    | 72  |     |      |                                                 |
|                               |                    | 200 |                                                        | 52   |    | 56  |     |      |                                                 |
|                               |                    | 400 |                                                        | 40   |    | 35  |     |      |                                                 |

Tableau IV : Oedème sous-plantaire

- Pleurésies et péritonites : de la même manière, le tableau V donne le pourcentage d'inhibition des exsudations pleurale et péritonéale observé avec les différentes solutions, en fonction des doses d'acide niflumique administrées.

| Pourcentage d'inhibition<br>Doses d'acide niflumique mg/kg | Pleurésie au nitrate d'argent. | Pleurésie au bleu Evans | Péritonite au formol | Péritonite au Ringer |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| 12,5                                                       |                                |                         |                      | 5                    |
| 25                                                         | 10                             |                         |                      | 25                   |
| 50                                                         | 31                             | 23                      | 13                   | 20                   |
| 100                                                        | 42                             | 48                      | 35                   | 56                   |
| 200                                                        | 58                             | 73                      | 60                   | 67                   |
| 400                                                        |                                | 82                      | 72                   | 77                   |

Tableau V : Pleurésies et péritonites.

Dans ces quatre tests, on observe une bonne inhibition, preuve d'une activité anti-inflammatoire, supérieure à celle de l'aspirine.

#### I.3.2.2. : Autres propriétés de l'acide niflumique :

Il exerce une action analgésique et une action antipyrétique. L'action analgésique évaluée avec la méthode de la plaque chauffante semble comparable à celle de l'aspirine; par contre l'action antipyrétique est controversée (2).

Dans le cadre de l'étude toxicologique, RAINSFORD (28) a comparé, sur des rats préalablement soumis à un stress, les toxicités gastriques de plusieurs anti-inflammatoires; il a ainsi défini trois catégories :

- dans la première, nous retrouvons le sulindac, le bénomilate d'action ulcérogène faible,
- dans la deuxième, les acides niflumique, méfénamique et flufenamique ainsi que la phénylbutazone, d'action ulcérogène intermédiaire,
- dans la troisième, l'aspirine, l'indométhacine, le diclofénac, d'action ulcérogène élevée.

#### I.3.3. : Présentation commerciale :

##### I.3.3.1. : En médecine humaine :

I.3.3.1.1. : formes commerciales : l'acide niflumique est commercialisé sous quatre formes :

- Nifluril° gélules dosées à 250 mg d'acide niflumique,
- Nifluril° suppositoires adultes dosés à 0,7 g d'ester morpholino-éthylique de l'acide niflumique,
- Nifluril° suppositoires enfants dosés à 0,4 g d'ester morpholino-éthylique de l'acide niflumique,
- Nifluril° pommade à 3 p. 100 d'acide niflumique.

I.3.3.1.2. : indications : Nifluril° peut être prescrit dans tous les états inflammatoires divers comme les rhumatismes inflammatoires chroniques, la goutte aiguë.

I.3.3.1.3. : Posologie : 2 à 4 gélules par jour,  
à prendre au milieu ou en fin des repas.

I.3.3.2. : En médecine vétérinaire :

I.3.3.2.1. Félalgyl°, spécialité pour chat :

Tableau C.

- |                                             |          |
|---------------------------------------------|----------|
| - Composition : acide niflumique,           | 5mg      |
| silicate de magnésium activé et d'aluminium | 35mg     |
| excipient q.s.p.                            | Igranule |

L'adjonction d'un pansement gastro-intestinal a pour but d'éviter l'apparition des gastralgies,

- indications : douleurs consécutives à des traumatismes, rhumatismes articulaires et musculaires...,

- Félalgyl° est administré per os à la dose d'un granule matin et soir jusqu'à amélioration,

I.3.3.2.2. : Sepvadol canin° : tableau C.

- |                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| - Composition : acide niflumique | 62 mg      |
| attapulgite                      | 350 mg     |
| excipient q.s.p.                 | I comprimé |

L'attapulgite est un pansement gastro-intestinal.

- indications : arthrites, périarthrites, arthroses, tendinites, entorses, myalgies...

- Sepvadol canin° est administré à la dose de 2 comprimés matin et soir chez un chien de 10 à 20 kg.

I.3.4. : Etude du métabolisme de l'acide niflumique dans différentes espèces :

Cette étude bibliographique préalable à notre expérimentation, va nous guider pour établir notre protocole expérimental et va nous permettre d'établir des comparaisons entre les différentes espèces.

#### I.3.4.1. : Etude pharmacocinétique :

Nous allons, dans le tableau VI, donner les principaux résultats obtenus dans des études antérieures effectuées chez le rat, le lapin, le chien et l'homme.

BOISSIER et coll. ont dosé l'acide niflumique par spectrophotométrie UV à 286 nm (3, 4), GLASSON et coll. (14), ainsi que LAN (21), ont utilisé de l'acide niflumique marqué au  $^{14}\text{C}$  sur la fonction carboxylique.

La radioactivité est déterminée directement par scintillation liquide sur les différents prélèvements.

A la lecture du tableau VI, nous remarquons des divergences dans les résultats obtenus par les deux équipes qui ont étudié la cinétique de l'acide niflumique chez l'homme. Les durées d'élimination urinaires et fécales, ainsi que la persistance des taux plasmatiques sont nettement plus élevées dans l'étude effectuée par BOISSIER et coll. Il faut peut-être rechercher dans le protocole expérimental l'explication de ces résultats contradictoires. BOISSIER et coll. (4) ont eu recours à une administration unique de 1250 mg d'acide niflumique tandis que LAN et coll. (21) ont prescrit une gélule dosée à 250 mg 4 fois par jour pendant 14 jours; l'étude pharmacocinétique a été réalisée par mesure de la radioactivité, après l'ingestion de la première dose du dixième jour qui seule contient de l'acide niflumique marqué au  $^{14}\text{C}$  sur la fonction carboxylique.

La fixation de l'acide niflumique aux protéines plasmatiques a été étudiée par PLESSAS (26); il a montré *in vitro* que, quelque soit l'espèce dont provient le plasma, l'origine de ce plasma ne joue aucun rôle sur le degré de liaison. Il a travaillé en particulier sur des plasmas de rat, de lapin, de cobaye et d'homme. La quasi-totalité de l'acide niflumique se lie aux protéines jusqu'à un seuil de saturation, difficilement atteint en règle générale. Le taux de liaison est influencé par le pH et est maximum à pH 7,4. L'acide niflumique se lie à la préalbumine, l'albumine, l' $\alpha_1$ , lipoprotéine et l' $\alpha_2$  lipoprotéine.

#### I.3.4.2. : Biotransformations de l'acide niflumique :

Dans le tableau VII, nous rappelons les différents métabolites identifiés lors de l'étude du métabolisme effectuée chez le rat, le lapin, le chien et l'homme.

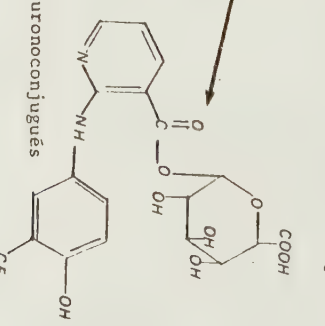
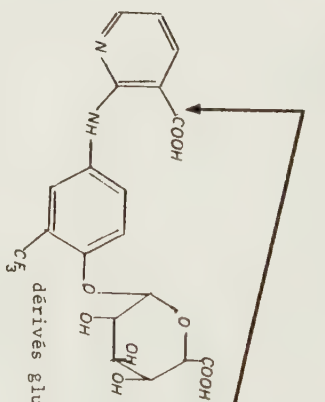
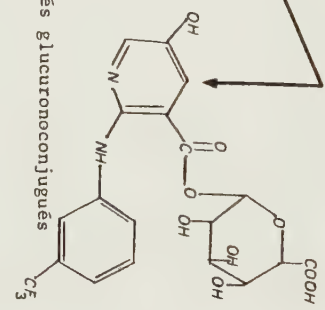
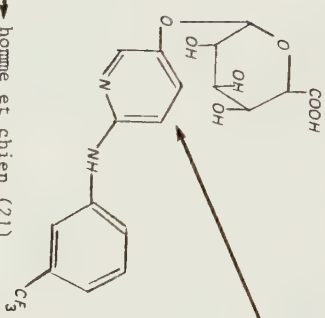
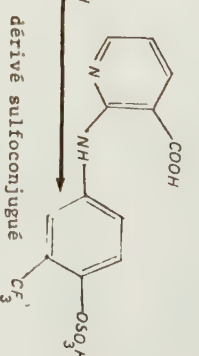
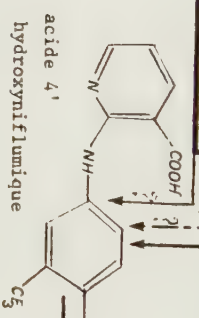
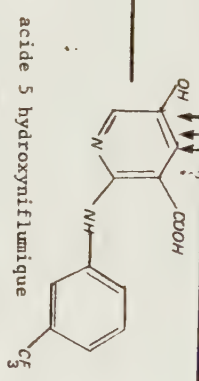
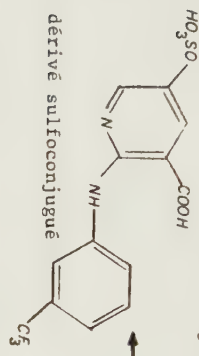
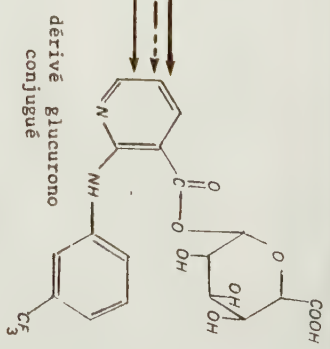
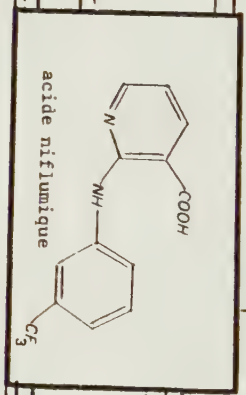
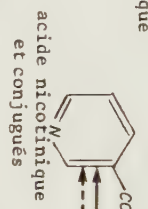
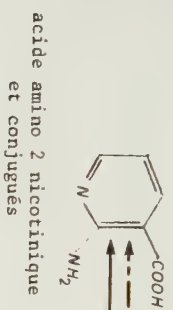
| Espèce étudiée   | Voie d'administration                | Taux plasmatique                                     | pic plasm. | demi-vie     | Liaison aux protéines | Elimination urinaire                                                                                                        | Elimination fécale                          | Elimination biliaire                | Fixation tissulaire                                      |
|------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------|------------|--------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Rat (14, 15)     | intra péritonéale<br>50 mg/kg        | 1h : 75 mcg/ml<br>6h : 14 mcg/ml<br>24h : 5,8 mcg/ml |            | 5 h          | Supérieure à 85 p 100 | maximum entre 4 et 8 h après administration, elle est de 30 % en 12 h.                                                      | négligeable<br>0,7 %                        | importante : cycle entéro-hépatique | foie<br>rein<br>estomac<br>intestin<br>vésicule biliaire |
| Lapin (3)        | I.V                                  | Décroissance, fonction exponentielle du temps        |            | 100 à 300 mn | nulle                 | 24 h : 38 % de la dose initiale est éliminée<br>48 h : fin de l'élimination urinaire, 50 % de la dose initiale est éliminée |                                             |                                     | rein<br>foie<br>coeur                                    |
|                  | per os<br>100 mg/kg                  |                                                      | I/2 à 1 h. |              | nulle                 | id IV                                                                                                                       |                                             |                                     | id IV                                                    |
| Chien (21)       | per os<br>10 mg/kg                   |                                                      | I à 2 h    | 5 h          |                       | 20 p 100 en 72 h                                                                                                            | 80 % en 72 h<br>id. si administration en IV | prépondérante                       |                                                          |
| Homme (4, 7, 21) | per os<br>250 mg (21)<br>1250 mg (4) | s'annule en 48 h<br>5 jours                          | 3 h<br>24h | 2 h          | 82 %                  | 40 % en 48 h<br>42 % de 4 à 7 j.                                                                                            | 30 % en 72 h<br>7 % en 3 à 6 j              |                                     |                                                          |

Tableau VI : Comparaison de la pharmacocinétique de l'acide niflumique dans différentes espèces

| Métabolites retrouvés                               | SANG |       |       |       |                                 | URINE |                              |                  |                                 | FECES                                                 |                  |  |
|-----------------------------------------------------|------|-------|-------|-------|---------------------------------|-------|------------------------------|------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------|--|
|                                                     | Rat  | Lapin | Chien | Homme | Rat                             | Lapin | Chien<br>7-24 h.             | Homme<br>0-12 h. | Rat                             | Chien<br>0-24 h.                                      | Homme<br>0-24 h. |  |
| Acide niflumique inchangé                           | +    | +     | +     | +     |                                 |       | +                            | +                |                                 | +                                                     | +                |  |
| Acide niflumique glucuro-<br>noconjugué             |      |       |       | +     | +                               | +     | +                            | +                |                                 | +                                                     | +                |  |
| Acide amino2 nicotinique<br>- libre<br>- conjugué   |      | +     |       |       | +                               | +     |                              |                  |                                 |                                                       |                  |  |
| Acide nicotinique                                   |      |       |       |       |                                 | +     |                              |                  |                                 |                                                       |                  |  |
| m trifluorométhylaniline                            |      |       |       |       |                                 | +     |                              |                  |                                 |                                                       |                  |  |
| Acide 5 hydroxyniflumique<br>- libre<br>- conjugué  |      |       |       |       |                                 | +     | +                            | +                |                                 | +                                                     | +                |  |
| Acide 4' hydroxyniflumique<br>- libre<br>- conjugué |      |       |       |       |                                 | +     | +                            | +                |                                 | +                                                     | +                |  |
|                                                     |      |       |       |       | il existe<br>5 métabo-<br>lites |       | 75 % de formes<br>conjuguées |                  | il existe<br>4 métabo-<br>lites | hydrolyse des formes<br>conjuguées dans<br>l'intestin |                  |  |

Tableau VII : principaux métabolites de l'acide niflumique

+ molécules retrouvées  
 +? : molécules dont l'existence n'est pas confirmée avec certitude  
 + : molécules retrouvées à l'état de traces.



→ homme et chien (21)  
→ lapin (3)  
→ rat (14)  
- - - ?  
→ voie métabolique supposée

Tableau VIII : biotransformations de l'acide nifluminique dans différentes espèces  
Résumé des voies métaboliques proposées par plusieurs auteurs.

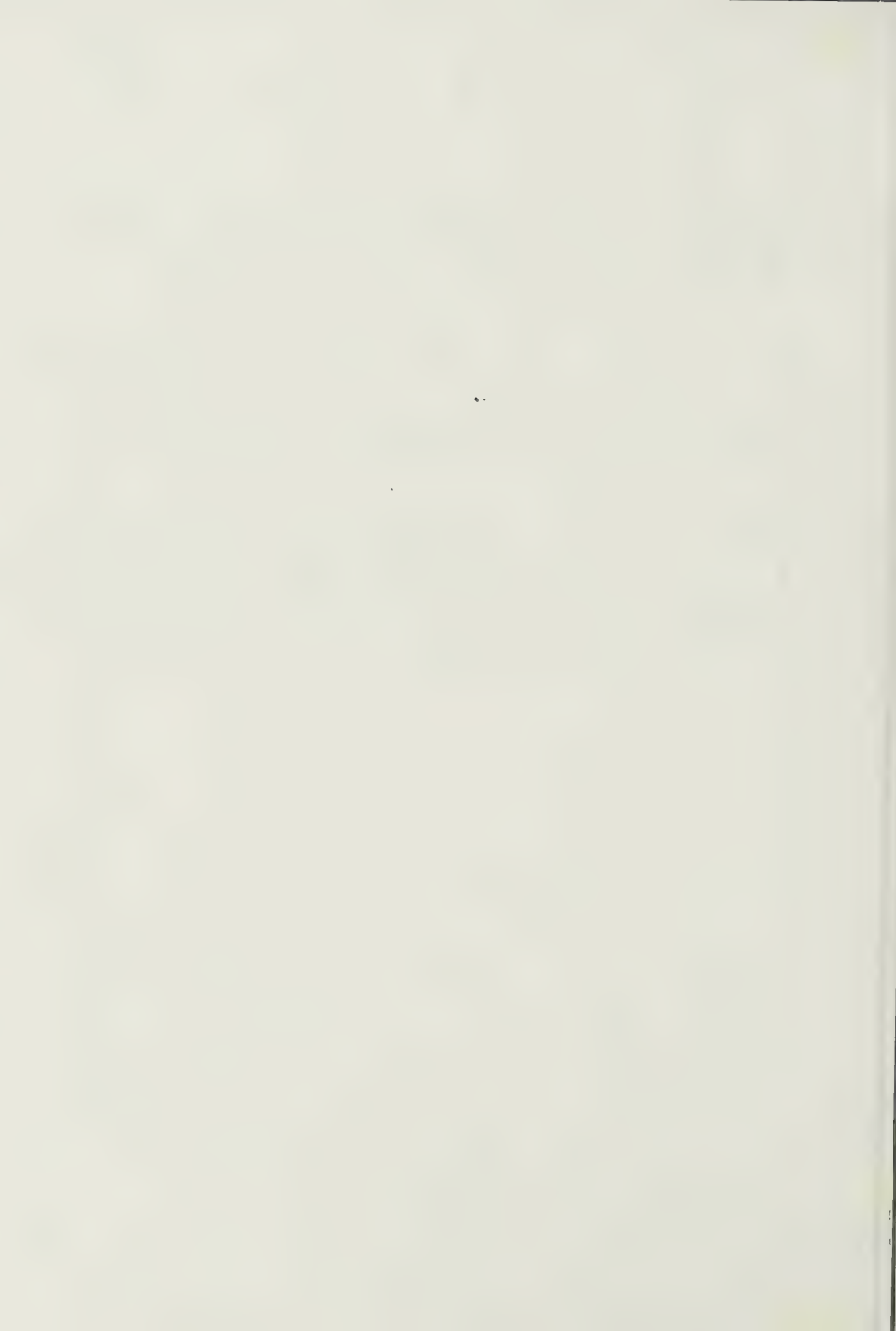
Chez le rat, du  $^{14}\text{CO}_2$  a été retrouvé dans le gaz expiré indiquant une décarboxylation ; les catabolites décarboxylés n'ont pu être détectés car le marquage radioactif portait sur la fonction carboxylique. Chez l'homme, et chez le chien, ces catabolites n'ont pas été mis en évidence.

I.3.4.3. : Voies métaboliques possibles pour l'acide niflumique :

Le tableau VIII résume les voies métaboliques proposées par les différents auteurs.

Nous voyons que les principales transformations subies par l'acide niflumique dans l'organisme sont des hydroxylations et des conjugaisons.

L'étude pharmacocinétique de l'acide niflumique chez le cheval n'a pas encore été entreprise. En raison de la réglementation en vigueur dans cette espèce concernant l'utilisation des produits anti-inflammatoires avant une course ou un concours hippique, la connaissance de la cinétique d'élimination de l'acide niflumique est un complément indispensable à la mise en place d'un contrôle anti-dopage.



## PARTIE EXPERIMENTALE

Etude pharmacocinétique de l'acide niflumique chez le Cheval.

Cette partie expérimentale se divise en deux chapîtres; nous envisagerons tout d'abord l'étude de la méthode analytique utilisée pour doser l'acide niflumique dans le plasma, l'urine et les fèces, puis nous aborderons l'étude pharmacocinétique effectuée chez le Cheval.



## II.1 : Méthode analytique :

Cette méthode a été mise au point sur des échantillons de plasma, urine et fèces supplémentés en acide niflumique puis a été contrôlée sur des prélèvements effectués lors d'une première expérimentation dans laquelle nous avons administré de l'acide niflumique per os à un cheval.

Nous allons envisager successivement le dosage de l'acide niflumique dans le plasma, dans l'urine et dans les fèces.

### II.1.1. : Dosage de l'acide niflumique libre dans le plasma :

Le dosage de l'acide niflumique libre dans le plasma comprend deux étapes, l'extraction par l'éther éthylique en milieu acide et la dérivation, puis le dosage par chromatographie en phase gazeuse, sous forme de dérivé méthylé.

#### II.1.1.1. : Extraction et dérivation :

##### II.1.1.1.1. : Réactifs :

- éther éthylique bidistillé,
- tampon pH I glycolle - acide chlorhydrique (Merck réf.988I)
- étalon interne : solution méthanolique de diclofénac à 10 mg/l
- réactif de dérivation : solution méthanolique de triméthylanilinium hydroxyde 0,1 M (Méth Elut, réactif Pierce réf. 4930I) dilué deux fois dans du méthanol distillé.

##### II.1.1.1.2. : Matériel :

- tubes S.V.L. 10 ml,
- micropipettes type "Micropettor" SMI de 30 µl,
- agitateur "Vortex",
- bloc chauffant avec évaporation sous azote sec,
- tube conique de 2 ml pour dérivation,

II.1.1.1.3. : Extraction : dans un tube SVL de 10 ml nous ajoutons successivement :

- 1 ml de plasma,
- 1,5 ml de tampon pH 1,
- 30 mcl de la solution d'étalon interne.

Chaque tube est agité pendant 30 secondes au "Vortex". Nous extrayons ensuite deux fois par 5 ml d'éther éthylique sous agitation manuelle pendant 3 minutes ; puis les deux phases éthérées sont réunies et évaporées à sec sous courant d'azote à 65°C.

II.1.1.1.4. : Dérivation :

Le résidu sec est repris deux fois par 1 ml d'éther éthylique, en transvidant chaque fois l'éther éthylique dans un tube conique. Ensuite, nous évaporons à sec sous courant d'azote à 65°C puis nous ajoutons 30 mcl de réactif "Meth Elut" dilué deux fois (si lors du dosage la concentration obtenue est trop élevée et sort de la gamme de linéarité, il convient de diluer l'extrait final).

Dans ces conditions opératoires, le pourcentage de récupération est de 86%).

II.1.1.2. : Dosage par chromatographie en phase gazeuse :

I.1.1.2.1. : Conditions chromatographiques :

- appareil : Packard Becker type 409
- détecteur : capture d'élection <sup>63</sup>Ni à fréquence variable (type 902),
- colonne : verre silanisé,  
longueur 2 m,  
diamètre intérieur : 3 mm,
- phase : mélange SE 30 - SP 2401
- support : chromosorb W/AW  $\gamma$  DMCS  
100-120 mesh
- imprégnation : SE 30 4 %  
SP 2401 6 %

- température : injecteur 300°C,  
four : 180°C à 230°C à raison de  
2,5°C /mn,  
détecteur : 280°C,
- débits : gaz vecteur : azote HP 40 ml/mn,  
purge détecteur : azote HP 10 ml/mn,
- enregistreur : SEFRAM,
- vitesse d'enregistrement : 2,5 mm/mn.

Dans ces conditions, le temps de rétention relatif de l'acide niflumique par rapport à l'étalon interne est de 0,68 (figure I).

#### I.1.1.2.2. : Calculs :

La concentration plasmatique en acide niflumique est calculée selon la méthode de l'étalon interne.

##### a) Concentration en acide niflumique :

$$C_i = \frac{M_i \times V_r}{V_j \times V_p}$$

$C_i$  : concentration plasmatique en acide niflumique en ng/ml

$V_r$  : volume de reprise de l'extrait sec ;  $V_r = 30$  mcl

$V_j$  : volume injecté  $V_j = 1$  mcl,

$V_p$  : volume de la fraction aliquote du prélèvement  
 $V_p = 1$  ml,

$M_i$  : masse d'acide niflumique injecté.

##### b) Masse d'acide niflumique injectée $M_i$ :

$$M_i = \frac{M_e \times S_i}{S_e} \times K_i$$

$M_e$  : masse de l'étalon interne injectée

$S_e$  : surface du pic correspondant à l'étalon interne

$S_i$  : surface du pic correspondant à l'acide niflumique,

$K_i$  : facteur de réponse de l'acide niflumique par rapport à l'étalon interne.



Figure I : Chromatogramme d'une solution étalon.

Nous avons réalisé une courbe d'étalonnage pour vérifier la linéarité de la réponse du détecteur en fonction de la masse d'acide niflumique.

- Mode opératoire : 1 ml de plasma est supplémenté avec 30 ml de la solution d'étalon interne et avec 30 mcl d'une solution d'acide niflumique de concentration variable (0,25 ng/mcl, 0,5 ng/mcl, 1,25 ng/mcl, 2,5 ng/mcl et 5 ng/mcl). L'extraction, la dérivation et le dosage sont réalisés selon la méthode décrite précédemment.

- Résultats :  $M_1$  : Masse d'acide niflumique injectée,

$S_i/S_e$  : rapport des surfaces des pics d'acide niflumique et de diclofénac ; les surfaces des pics sont déterminées par triangulation (hauteur du pic X largeur à mi-hauteur).

| $M_1$<br>x | $S_i/S_e$<br>y |
|------------|----------------|
| 5          | 0,53           |
| 2,5        | 0,20           |
| 1,25       | 0,10           |
| 0,5        | 0,05           |
| 0,25       | 0,03           |

Nous obtenons une droite d'équation  $y = 0,08 X + 0,01$  avec un coefficient de régression  $r^2 = 0,998$ .

La réponse du détecteur est donc linéaire pour des masses injectées allant de 0,25 à 5 ng d'acide niflumique injecté.

$K_1$  est déterminé à l'occasion de chaque série d'analyse.

Cette méthode nous permet de détecter spécifiquement une concentration supérieure ou égale à 10 ppb soit  $10^{-8}$  g/ml de plasma à partir de 1 ml de plasma.

#### II.1.2. : Dosage de l'acide niflumique dans l'urine :

Après extraction par l'éther éthylique en milieu acide, purification par chromatographie en couche mince et dérivation, l'acide niflumique est dosé par chromatographie en phase gazeuse.

Dans cette partie, nous ne détaillerons que la technique d'extraction et de purification, les méthodes d'analyse et de quantification par chromatographie en phase gazeuse restant les mêmes que pour le dosage de l'acide niflumique dans le plasma.

##### II.1.2.1. : Hydrolyse des urines :

Cette hydrolyse va libérer l'acide niflumique de ses conjugaisons avec l'acide glycuronique et avec l'acide sulfurique. Après hydrolyse, nous doserons l'acide niflumique total éliminé soit en nature soit sous forme conjuguée.

##### II.1.2.1.1. : Réactifs :

- étalon interne : solution méthanolique de diclofénac à 5 mg/l
- suc d'*Helix Pomatia* (réactif IBF) contenant  $10^5$  unités de glucuronidase (Fishman) et  $10^6$  unités de sulfatase (Roy).
- tampon pH 5,4 acéto-acétique, contenant :
  - soude normale 50,0 ml,
  - acide acétique normal 59,3 ml,
  - eau distillée qsp 500 ml.

II.1.2.1.2. : Matériel :

- tube SVL de 10 ml,
- pipette automatique de 1 ml,
- pipette automatique de 5 ml,
- bain-marie à 56°C.

II.1.2.1.3. : Méthode :

dans un tube SVL de 10 ml, nous disposons 5 ml d'urine, 3 ml de tampon pH 5,4, 200 mcl de la solution d'étalon interne et 30 mcl de suc d'*Helix Pomatia*; l'ensemble est porté au bain- marie à 56°C pendant 3 heures.

II.1.2.2. : Extraction :

II.1.2.2.1. : Réactifs :

- tampon pH 1 glycolle - acide chlorhydrique  
(Merck, réf. 9881)
- éther éthylique distillé.

II.1.2.2.2. : Matériel :

- tube SVL de 10 ml,
- pipette automatique 1 ml,
- pipette de 5 ml.

II.1.2.2.3. : Méthode :

Dans un tube SVL de 10 ml, nous déposons successivement :

- I ml d'urine précédemment hydrolysée,
- 2 ml de tampon pH I,
- 5 ml d'éther distillé.

Le tube est bouché et agité pendant 2 minutes; après décantation, la phase étherée est prélevée et transvasée dans un autre tube.

Cette opération est recommencée puis les 2 phases étherées sont réunies et évaporées à sec sous courant d'azote à 65°C.

II.1.2.3. : Purification :

II.1.2.3.1. : réactifs :

- méthanol distillé,
- plaques pour chromatographie sur couche mince en gel de silice 60 F 254, de 20 cm de côté et de 0,2 mm d'épaisseur (Merck, réf. 5554),
- toluène,
- dioxane,
- acide acétique glacial,
- chlorure de méthylène distillé,
- solution étalon d'acide niflumique à 250 mg/ dans du méthanol,
- solution étalon diclofénac à 250 mg/l dans du méthanol.

II.1.2.3.2. : matériel :

- pipettes pasteur,
- entonnoir,
- laine de verre,
- tubes SVL de 10 ml,
- erlenmeyer de 100 ml,

II.1.2.3.3. : méthode :

- reprendre le résidu d'extraction deux fois par 30 ml de méthanol distillé,

- déposer la solution obtenue sur la plaque de chromatographie en petites bandes de 1,5 cm de long ; trois spots sont effectués. Les solutions étalons de diclofénac et d'acide niflumique sont déposées de même aux deux extrémités.

- laisser migrer dans le solvant toluène (90 ml) dioxane (20 ml), acide acétique (10 ml),

- identifier les spots d'acide niflumique et de diclofénac sous lumière ultra-violette à 254 nm,

- découper la plaque en petits rectangles entre les deux spots étalons, pour chaque échantillon,

- déposer chaque rectangle dans un erlenmeyer de 100 ml dans lequel 4 ml de dichlorométhane distillé sont ajoutés,

- agiter vigoureusement, puis filtrer sur laine de verre, rincer l'erlenmeyer avec 4 ml de dichlorométhane distillé, qui est également filtré,

- recueillir le filtrat dans un tube de 10 ml et évaporer à sec sous courant d'azote à 65°C.

Ensuite, nous abordons les phases de dérivation et de chromatographie en phase gazeuse, identiques à celles décrites pour le plasma.

Cette méthode permet de déceler spécifiquement une concentration supérieure ou égale à 5 ppb à partir de 1 ml d'urine.

### II.1.3. : Dosage de l'acide niflumique dans les fèces :

Après extraction par l'éther éthylique en milieu acide, purification par chromatographie en couche mince et dérivation, l'acide niflumique est dosé par chromatographie en phase gazeuse.

Dans cette partie, nous ne détaillerons que la technique d'extraction, la technique de purification et les méthodes d'analyse et de quantification par chromatographie en phase gazeuse restant les mêmes que pour le dosage de l'acide niflumique dans l'urine.

#### II.1.3.1. : Extraction :

##### II.1.3.1.1. : Réactifs :

- étalon interne : solution méthanolique de diclofénac à 5 mg/l,
- éther éthylique distillé,

##### II.1.3.1.2. : Matériel :

- ampoule à décanter de 250 ml,
- agitateur "Vortex",
- bécher de 100 ml,
- tube SVL de 10 ml,
- bloc chauffant avec évaporation sous courant d'azote,
- pipette automatique de 200 µl,

##### II.1.3.1.3. : Méthode :

- déposer successivement dans une ampoule à décanter de 250 ml : 10 g de fèces,
- 100 µl de la solution d'étalon interne,
- 30 ml d'éther,
- extraire 2 fois par 30 ml d'éther, sous agitation manuelle, pendant 5 minutes,
- réunir les deux phases éthérées et les évaporer jusqu'à 5 ml environ.
- transvaser la phase éthérée résiduelle dans un tube SVL de 10 ml et rincer le bécher avec 5 ml d'éther.
- réunir les deux phases éthérées et évaporer à sec sous courant d'azote à 65°C.

II.1.3.2. : Purification :

II.1.3.2.1. : Réactifs :

- méthanol distillé,

II.1.3.2.2. : Matériel :

- tubes coniques de dérivation de 2 ml,

- agitateur de type "Vortex",

- pipette automatique de 50 mcl.

II.1.3.2.3. : Méthode :

Le résidu sec est repris par 5 ml de méthanol et agité 30 secondes au "Vortex". De ce tube, 1 ml est prélevé et placé dans un tube conique. Le méthanol est évaporé à sec sous courant d'azote à 65°C, et le résidu sec est repris deux fois par 30 mcl de méthanol distillé. La solution obtenue est déposée sur la plaque de chromatographie.

Les phases suivantes, chromatographie sur couche mince, dérivation, chromatographie en phase gazeuse sont identiques à celles décrites pour le dosage de l'acide niflumique dans l'urine. Le pourcentage de récupération est de 80 %. Cette méthode nous permet de détecter spécifiquement une concentration supérieure ou égale à 10 ppb.

Au bilan, la méthode analytique ainsi mise au point permet d'identifier l'acide niflumique dans le plasma, l'urine et les fèces avec une sensibilité (5 à 10ppb) compatible avec une étude pharmacocinétique. Cette méthode est également sensible et spécifique, caractéristiques indispensables à son application dans le cadre du contrôle anti-dopage.

## II.2. : Pharmacocinétique de l'acide niflumique chez le

### cheval

#### II.2.1. : Protocole expérimental :

##### II.2.1.1. : Les animaux :

L'expérimentation a porté sur six chevaux hongres, âgés de 13 à 17 ans, de race selle français. Ces chevaux sont logés, pendant la durée de l'expérimentation, en box individuel, sur aire paillée. Les chevaux reçoivent chaque jour environ 7 à 8 kg de foin et 3 kg de granulés. L'eau est distribuée ad libitum au moyen d'abreuvoir automatique. Trois chevaux seront utilisés pour l'administration per os et trois pour l'application de pommade. Avant l'expérimentation, un examen clinique des chevaux est effectué, afin de ne retenir que les chevaux en bonne santé, l'aspect efficacité thérapeutique de l'acide niflumique chez le cheval n'a pas été abordé dans cette étude.

##### II.2.1.2. : Mode d'administration.

###### II.2.1.2.1. : Administration per os :

Le matin, avant la distribution de foin, chaque cheval reçoit 10 g d'acide niflumique poudre, mélangé avec 500 g d'avoine. Pour mener cette étude, nous nous sommes placés dans des conditions se rapprochant le plus des conditions naturelles ; il est rare, en effet, que des animaux soient logés sur aire non paillée ; ce mode de logement implique que les animaux ne sont pas à jeun, la paille étant à leur disposition. De même, le mode d'administration choisi est le plus simple, tout en étant beaucoup moins rigoureux qu'une administration avec une sonde naso-oesophagienne par exemple. La quantité d'acide niflumique réellement absorbée par le cheval ne peut donc être connue avec précision, du fait de pertes au cours de la préhension et de la mastication en particulier.

Mais nous contrôlons que les animaux absorbent effectivement la totalité du mélange avoine-acide niflumique mis à leur disposition. Le temps  $T_0$  marque le début du repas d'avoine ; les chevaux mettent en moyenne un quart d'heure, pour absorber la totalité de l'avoine.

Le même protocole est répété trois jours consécutifs.

#### II.2.1.2.2. : Application de pommade :

Nous avons utilisé du Nifluril pommade<sup>o</sup> à 3 p. 100 d'acide niflumique. Elle est appliquée par massage prolongé à raison de 15 g. sur chaque jarret préalablement tondu. Les jarrets sont tondues et non rasés pour se rapprocher, ici également, des conditions naturelles. Chaque cheval reçoit 30 g. de pommade (soit 0,9 g d'acide niflumique), quantité de pommade habituellement appliquée chez le cheval.

#### II.2.1.3. : Prélèvements sanguins :

##### II.2.1.3.1. : Matériel :

Les prélèvements sont effectués avec des tubes héparinés, sous vide, de 10 cm<sup>3</sup> (Ref : Vacutainers type 3200 KA I43 unités USP d'héparinate de sodium).

##### II.2.1.3.2. : Temps de prélèvement :

L'acide niflumique est administré chaque matin, pendant 3 jours. Le sang est alors prélevé par ponction de la veine jugulaire aux temps 0, 30 mn, 1 h, 1 h 30 mn, 2 h, 2 h 30mn, 3 h, 3 h 30, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h. Après le troisième jour, les prélèvements sont poursuivis jusqu'aux temps 24 h et 48 heures (Tableau IX). Immédiatement après le prélèvement, le sang est centrifugé à 3 000 t/mn pendant 15 minutes. Le plasma est séparé des hématies et conservé à - 18°C jusqu'à l'analyse.

#### II.2.1.4. : Prélèvements d'urine :

##### II.2.1.4.1. : Matériel :

Nous disposons pour recueillir l'urine d'un urinal, sac de toile imperméable, maintenu par des sangles sous le ventre du cheval. Dans une manipulation préliminaire, nous avons prélevé pendant une journée l'urine en continu grâce à un collecteur de fraction, relié à l'urinal.

#### II.2.1.4.2. : Temps de prélèvement :

a) manipulation préliminaire : l'urine émise est recueillie par fraction de 1 h 30 mn pendant 25 h 30 mn; ensuite le collecteur de fraction est remplacé par un urinal, qui est relevé aux temps de 48 h et 54 heures.

b) durant l'expérimentation, l'urinal est mis en place au temps  $T_0$ , puis est retiré régulièrement aux temps 6 h et 24 h pendant six jours (Tableau IX).

Le volume d'urine émis est mesuré et un échantillon de 50 cm<sup>3</sup> est prélevé après homogénéisation, puis est conservé à - 18°C jusqu'à l'analyse.

#### II.2.1.5. : Prélèvement de fèces :

Un échantillon de fèces, de 500 g environ est prélevé chaque jour pendant 4 jours, au temps 6 h.

Nous n'avons pu, pour des problèmes matériels, mesurer la quantité totale de fèces émises en 24 heures, nous ne pourrions donc pas connaître la quantité d'acide niflumique éliminée par cette voie.

Nous allons, dans le tableau IX récapituler toutes les opérations effectuées dans l'ordre chronologique.

| Jours          | Prélèvements           | HEURES |     |   |     |   |     |   |     |   |   |             |   |    |  |          |                |
|----------------|------------------------|--------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|-------------|---|----|--|----------|----------------|
|                |                        | 0      | 0,5 | I | I,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 5 | 6           | 8 |    |  |          |                |
| J <sub>1</sub> | sang<br>urine<br>fèces | 0<br>0 |     |   |     |   |     |   |     |   |   | 6<br>6      |   |    |  |          |                |
| J <sub>2</sub> | sang<br>urine<br>fèces | 0<br>0 |     |   |     |   |     |   |     |   |   | 6<br>6<br>6 |   |    |  |          |                |
| J <sub>3</sub> | sang<br>urine<br>fèces | 0<br>0 |     |   |     |   |     |   |     |   |   | 6<br>6<br>6 | 8 | 24 |  | 48<br>30 | 48<br>54<br>72 |

↑  
administration de l'acide niflumique

Tableau IX : Heuré des différents prélèvements

Tous les prélèvements sont alors analysés, les détails de la méthode analytique figurant dans le chapitre précédent.

## II.2.2. : Résultats :

Nous envisagerons tout d'abord les résultats obtenus lors de l'administration per os et ensuite ceux obtenus lors de l'application de pommade.

### II.2.2.1. : Administration répétée d'acide niflumique per os :

Nous étudierons successivement les concentrations plasmatiques, puis l'élimination urinaire et fécale.

#### II.2.2.1.1. : Concentration plasmatique :

Après avoir indiqué les valeurs des concentrations plasmatiques, nous calculerons les divers paramètres pharmacocinétiques.

a) concentrations plasmatiques : elles figurent dans le tableau X; la figure 2 indique les variations moyennes des concentrations plasmatiques en fonction du temps.

b) détermination des paramètres pharmacocinétiques : pour chaque cheval et pour chaque administration, nous avons déterminé les divers paramètres pharmacocinétiques de la phase d'élimination. Nous avons essayé d'ajuster une courbe théorique aux valeurs expérimentales, selon un modèle à un compartiment pour la phase d'élimination; dans ces conditions, l'équation de la courbe donnant la concentration plasmatique en fonction du temps est du type :

$$c = c_0 e^{-k_e t}$$

$c$  = concentration plasmatique au temps  $t$

$c_0$  = concentration plasmatique extrapolée au temps zéro à partir de la droite  $\log c = f(t)$

$k_e$  = constante d'élimination.

| Temps | CHEVAL I<br>Concentration plasmatique<br>mcg/ml |         |         | CHEVAL II<br>Concentration plasmatique<br>mcg/ml |         |         | CHEVAL III<br>Concentration plasmatique<br>mcg/ml |         |         | MOYENNE<br>Concentration plasmatique<br>mcg/ml |         |         |
|-------|-------------------------------------------------|---------|---------|--------------------------------------------------|---------|---------|---------------------------------------------------|---------|---------|------------------------------------------------|---------|---------|
|       | 1e jour                                         | 2e jour | 3e jour | 1e jour                                          | 2e jour | 3e jour | 1e jour                                           | 2e jour | 3e jour | 1e jour                                        | 2e jour | 3e jour |
| T 0   | 0                                               | 1       | 1,6     | 0                                                | 1,9     | 0,9     | 0                                                 | 1,5     | 1,5     | 0                                              | 1,47    | 1,33    |
| 0,5   | 0,39                                            | 1,8     | 3,8     | 4,37                                             | 10,6    | 14,8    | -                                                 | 2,3     | 15,1    | 2,38                                           | 4,9     | 11,23   |
| 1     | 7,19                                            | 2       | 5,2     | 10,5                                             | 12,6    | 23,5    | 1,8                                               | 3,2     | 23,4    | 6,50                                           | 5,93    | 17,37   |
| 1,5   | 13,56                                           | 2       | 6,4     | 10,1                                             | 20,7    | 27      | 1,9                                               | 2,5     | 28,5    | 8,52                                           | 8,4     | 20,63   |
| 2     | 8,35                                            | 1,4     | 5,1     | 13,1                                             | 17,2    | 23,1    | 2,4                                               | 2       | 24,8    | 7,95                                           | 6,87    | 17,67   |
| 2,5   | 7,65                                            | 1,5     | 5       | 9,8                                              | 16,5    | 15,6    | 2,8                                               | 2       | 24      | 6,75                                           | 6,67    | 14,87   |
| 3     | 6,69                                            | 1,6     | 4,7     | 9,1                                              | 14      | 14,9    | 3                                                 | 1,8     | 20,8    | 6,26                                           | 5,80    | 13,47   |
| 3,5   | 3,39                                            | 1,3     | 4,2     | 9,9                                              | 12,4    | 14,6    | 2,4                                               | 1,9     | 16      | 5,23                                           | 5,20    | 11,6    |
| 4     | 3,9                                             | 1,2     | 4       | 7,9                                              | 9       | -       | 2,5                                               | 1,5     | 20,4    | 4,77                                           | 3,90    | 12,20   |
| 5     | 3                                               | 1,1     | 3,6     | 6,4                                              | 8,4     | 11,1    | 3,1                                               | 1,1     | 16      | 4,17                                           | 3,53    | 10,23   |
| 6     | 2                                               | 0,6     | 2,5     | 5,8                                              | 6,4     | 7,6     | 2,9                                               | 4,4     | 15,1    | 3,57                                           | 3,80    | 8,40    |
| 8     | 1,5                                             | 0,5     | 1,4     | 4,8                                              | 4,2     | 7,4     | 4,3                                               | 6,96    | 7,2     | 3,55                                           | 3,89    | 5,33    |
| 24    | 1                                               | 1,6     | 0,7     | 1,9                                              | 0,9     | 1,6     | 1,5                                               | 1,5     | 0,9     | 1,47                                           | 1,33    | 1,07    |
| 48    | -                                               | -       | 0       | -                                                | -       | 0       | -                                                 | -       | 0       | -                                              | -       | 0       |

Tableau X : Concentrations plasmatiques en acide niflumique après administration orale de 10 g d'acide niflumique par jour pendant 3 jours.

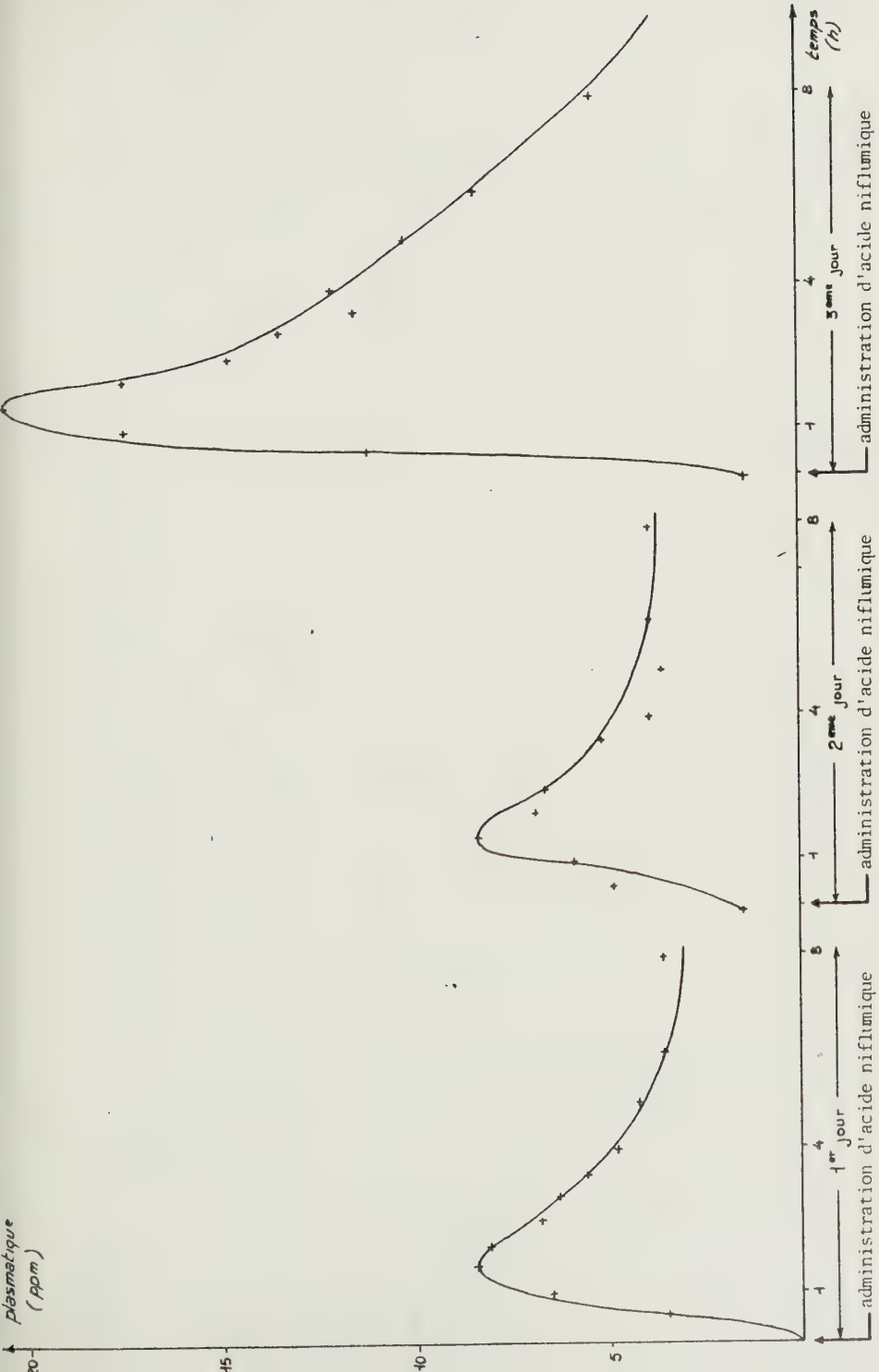


Figure 2 : Variation des concentrations plasmatiques moyennes après administration orale de 10 g d'acide niflumique pendant 3 jours.

| PARAMETRES                                          | CHEVAL I |         |         | CHEVAL II |         |         | CHEVAL III |         |         | MOYENNE  |         |         |
|-----------------------------------------------------|----------|---------|---------|-----------|---------|---------|------------|---------|---------|----------|---------|---------|
|                                                     | Ier jour | 2e jour | 3e jour | Ier jour  | 2e jour | 3e jour | Ier jour   | 2e jour | 3e jour | Ier jour | 2e jour | 3e jour |
| Nombre de points expérimentaux                      | 10       | 9       | 10      | 9         | 10      | 9       | 8          | 8       | 10      | 10       | 10      | 10      |
| Co                                                  | 6,83     | 2,61    | 5,66    | 11,31     | 18,87   | 22,15   | 2,39       | 3,64    | 33,10   | 7,25     | 6,87    | 19,81   |
| ke                                                  | 0,10     | 0,21    | 0,10    | 0,08      | 0,13    | 0,12    | -0,03      | 0,23    | 0,15    | -0,07    | -0,07   | -0,13   |
| Coefficient de régression de la phase d'élimination | 0,60     | 0,91    | 0,86    | 0,90      | 0,93    | 0,93    | 0,13       | 0,92    | 0,98    | 0,87     | 0,86    | 0,97    |
| Durée plasmatique (h)                               | 1,5      | 1,5     | 1,5     | 2         | 1,5     | 1,5     | 3          | 1       | 1,5     | 1,5      | 1,5     | 1,5     |
| Concentration maximale expérimentale ng/ml          | 13,56    | 2       | 6,4     | 13,1      | 20,7    | 27      | 3          | 3,2     | 28,5    | 8,52     | 8,4     | 20,63   |
| Demi-vie d'élimination                              | 6,90     | 3,29    | 6,90    | 8,63      | 5,31    | 5,75    | 23         | 3       | 4,60    | 9,86     | 9,86    | 5,31    |

Tableau XI : paramètres pharmacocinétiques de la phase d'élimination après administration orale de 10 g d'acide niflumique par jour pendant 3 jours.

concentration  
plasmatique

$$C = 7,25 e^{0,07 t}$$

$$C = 6,87 e^{0,07 t}$$

$$C = 19,81 e^{0,13 t}$$



Figure 3 : Variations du Log des concentrations plasmatiques moyennes, après administration orale de 10 g d'acide niflumique pendant 3 jours

↑ administration d'acide niflumique

Nous avons également calculé la demi-vie biologique ( $T_{1/2}$ ) qui représente le temps nécessaire pour faire décroître la concentration plasmatique de moitié

$$c = \frac{c_0}{2} \quad t = T_{1/2}$$

$$\frac{c_0}{2} = c_0 e^{-ke T_{1/2}}$$

$$\log C_0 - \log 2 = \log C_0 - ke T_{1/2}$$

$$T_{1/2} = \frac{\log 2}{ke}$$

Tous ces paramètres figurent dans le tableau XI.

La figure 3 représente les droites d'équation  $c = c_0 e^{-ke t}$ , caractéristiques de la phase d'élimination, tracées à partir des valeurs de la moyenne.

#### II.2.2.1.2. : Elimination urinaire :

a) manipulation préliminaire : l'urine est recueillie régulièrement dans le temps pendant 25 h 30 grâce à un collecteur de fractionnement. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau XII.

b) lors de l'expérimentation, suite à des aléas techniques, nous n'avons pu doser l'acide niflumique urinaire que sur deux des chevaux. Les résultats sont consignés dans le tableau XIII.

Nous avons choisi de ne doser l'acide niflumique qu'après hydrolyse des urines. Il convient de rappeler que cette étude a été menée dans le cadre du contrôle anti-dopage ; or, la recherche des agents dopants s'effectue sur des urines qui ont été prélevées plusieurs jours auparavant et qui n'ont pas subi de congélation. Dans ces urines, il se produit une hydrolyse spontanée, quasiment totale. Par conséquent, pour se rapprocher des conditions du contrôle de routine, nous reproduisons cette hydrolyse. Nous dosons donc l'acide niflumique éliminé en nature et celui éliminé sous forme de glucuronide ou de sulfo-conjugué, qui a subi l'hydrolyse.

| Temps<br>(heures) | Concentration<br>urinaire mg/l | Volume d'urine<br>l | Masse d'acide<br>niflumique ex-<br>crétée mg | Quantité totale<br>éliminée mg |
|-------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------------------------|--------------------------------|
| 0                 | 0                              | I                   | 0                                            | 0                              |
| 3 h               | I,26                           | I,I8                | I,49                                         | I,49                           |
| 4 h 30            | -                              | 0                   | 0                                            | I,49                           |
| 6 h               | 6,45                           | 0,210               | I,35                                         | 2,84                           |
| 7 h 30            | I,87                           | 0,99                | I,85                                         | 4,7                            |
| 9 h               | -                              | 0                   | 0                                            | 4,7                            |
| 10 h 30           | 2,08                           | I                   | 2,08                                         | 6,8                            |
| 12 h              | -                              | 0                   | 0                                            | 6,8                            |
| 13 h 30           | I,76                           | I,II                | I,95                                         | 8,7                            |
| 15 h              | -                              | 0                   | 0                                            | 8,7                            |
| 16 h 30           | I,3I                           | 0,680               | 0,9                                          | 9,6                            |
| 18 h              | -                              | 0                   | 0                                            | 9,6                            |
| 19 h 30           | I,98                           | 0,8I                | I,6I                                         | II,2                           |
| 2I h              | -                              | 0                   | 0                                            | II,2                           |
| 22 h 30           | -                              | 0                   | 0                                            | II,2                           |
| 24 h              | I,22                           | 0,9I                | I,II                                         | I2,3                           |
| 25 h 30           | -                              | 0                   | 0                                            | I2,3                           |
| 48 h              | -                              | 0                   | 0                                            | I2,3                           |
| 54 h              | 0,25                           | 3,2                 | 0,8                                          | I3,I                           |

Tableau XII : Elimination urinaire d'acide niflumique après  
administration de IO g per os.

| Temps de<br>prélève-<br>ments (h) | CHEVAL I                                        |                                    |                        |                                     | CHEVAL III                                     |                                    |                                       |                       | MOYENNE |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------|
|                                   | concentration<br>en acide<br>niflumique<br>mg/l | volume d'uri-<br>ne recueilli<br>l | masse excré-<br>tée mg | quantité<br>totale élimi-<br>née mg | concentration<br>en acide niflu-<br>mique mg/l | volume d'u-<br>rine recueilli<br>l | quantité to-<br>tale élimi-<br>née mg | masse cumu-<br>lée mg |         |
| 0                                 | -                                               | 1,5                                | 0                      | 0                                   | 0                                              | 2,1                                | 0                                     | 0                     | 0       |
| 6                                 | -                                               | 0                                  | 0                      | 0                                   | 0,46                                           | 1,18                               | 0,5                                   | 0,5                   | 0,25    |
| 24                                | 0,43                                            | 3,7                                | 1,6                    | 1,6                                 | 2,3                                            | 2,8                                | 6,4                                   | 6,9                   | 4,25    |
| 30                                | 0,56                                            | 4,2                                | 2,4                    | 4                                   | -                                              | 0                                  | 0                                     | 6,9                   | 5,45    |
| 48                                | 1,75                                            | 4,4                                | 7,7                    | 11,7                                | 5,64                                           | 2,1                                | 11,8                                  | 18,7                  | 15,2    |
| 54                                | 0,72                                            | 2,7                                | 1,9                    | 13,6                                | -                                              | 0                                  | 0                                     | 18,7                  | 16,15   |
| 72                                | 0,92                                            | 4,25                               | 3,9                    | 17,5                                | 7,7                                            | 2,7                                | 20,4                                  | 39,1                  | 28,3    |
| 78                                | 1,3                                             | 4,05                               | 5,3                    | 22,8                                | 1,5                                            | 1,37                               | 1,8                                   | 40,9                  | 31,85   |
| 96                                | 1,3                                             | 4,1                                | 5,4                    | 28,2                                | 2                                              | 4,1                                | 8,2                                   | 49,1                  | 38,65   |
| 102                               | 0,5                                             | 3,8                                | 1,9                    | 30,1                                | 0,5                                            | 1,53                               | 0,8                                   | 49,9                  | 40      |
| 120                               | 0,2                                             | 4,5                                | 0,9                    | 31                                  | 0,5                                            | 3,75                               | 1,8                                   | 51,7                  | 41,55   |

Tableau XIV : Elimination urinaire de l'acide niflumique après administrations de 10 g per os  
aux temps 0, 24 h, et 48 heures.

masse d'acide niflumique excrétée  
(mg)

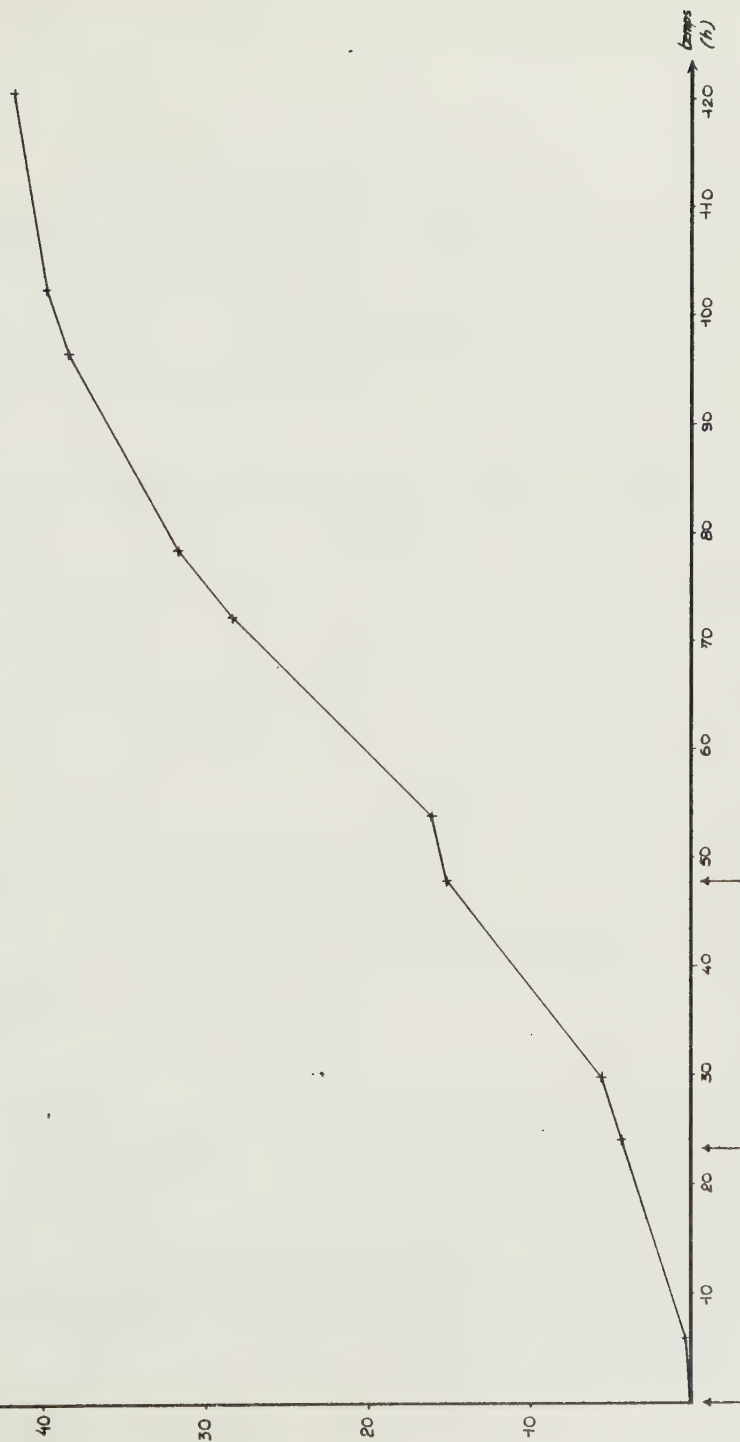


Figure 4 : Elimination urinaire totale moyenne d'acide niflumique après administration orale de 10g d'acide niflumique pendant 3 jours.

↑ administration d'acide niflumique.

### II.2.2.1.3. : Elimination fécale :

Nous avons analysé quelques échantillons de fèces, prélevés uniquement sur le cheval III. Le prélèvement de fèces n'étant pas effectué en routine lors du contrôle anti-dopage, nous débordons donc du cadre de notre étude. Cependant, au vu des résultats rapportés dans les autres espèces, nous avons voulu nous rendre compte de l'existence au nom d'une élimination fécale décelable. Les résultats sont consignés dans le tableau XV.

| Temps de prélèvement<br>(heures) | Concentration en<br>acide niflumique<br>ng/gMS <sup>1</sup> | Pourcentage d'humidité | Concentration<br>acide niflumique<br>ng/gMF <sup>2</sup> |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------|
| 0                                | 0                                                           |                        | 0                                                        |
| 24                               | 0,64                                                        | 81,22                  | 0,12                                                     |
| 48                               | 2,6                                                         | 81,63                  | 0,48                                                     |
| 72                               | 2,4                                                         | 81,44                  | 0,45                                                     |
| 96                               | 0,7                                                         | 86,39                  | 0,09                                                     |

Tableau XV : Elimination fécale de l'acide niflumique après administration per os de 10 g aux temps 0, 24 et 48 H.

1 MS : matière sèche,

2 MF : matière fraîche.

### II.2.2.2. : Application répétée d'acide niflumique pommade :

Les plasmas, urine et fèces des trois chevaux en expérimentation n'ont montré après analyse par chromatographie en phase gazeuse que des traces non quantifiables d'acide niflumique. Sa concentration est donc de l'ordre de 10 ppb dans le plasma et les fèces et de 5 ppb dans l'urine.

### II.2.3. : Discussion :

Nous allons reprendre point par point les principaux résultats apportés par notre expérimentation, en essayant de dégager les particularités spécifiques du cheval par rapport aux autres espèces envisagées dans la partie bibliographique.

### II.2.3.1. : Administration orale répétée :

Nous aborderons successivement l'étude des taux plasmatiques puis celle des éliminations urinaires et fécales.

#### II.2.3.1.1. : Concentration plasmatique :

La résorption digestive est comparable à celle rencontrée chez le chien et le lapin, les concentrations maximales étant observées 1 h 30 à 2 h après l'administration.

Chez les chevaux II et III, les concentrations maximales augmentent de la première à la troisième administration, mais ce phénomène n'est net que chez le cheval II ; les variations individuelles apparaissent donc importantes à ce niveau et ne nous permettent pas d'énoncer une règle générale. La demi-vie d'élimination varie de 3 heures à 23 heures ; les variations individuelles importantes, ainsi que le faible nombre d'animaux mis en expérimentation nous interdisent de tirer des conclusions précises. Les valeurs moyennes, de 9 h 50 mn les deux premiers jours et de 5 h 20 mn le dernier jour sont supérieures à celles rencontrées chez le chien 5 h (2I), chez le rat 3 h (I4) et l'homme 2 h (2I).

La totalité de l'acide niflumique administré a disparu du plasma 48 h après la dernière administration ; cette molécule a donc un métabolisme rapide. Ces résultats nous permettent de fixer un rythme d'administration : il est inutile d'administrer une dose de charge dans un premier temps, puis des doses d'entretien. Il faut préférer des administrations répétées d'une même dose, à intervalle de temps régulier, 12 heures par exemple, jusqu'à la rémission des symptômes.

#### II.2.3.1.2. : Elimination urinaire :

A la lecture du tableau XII, résumé des résultats obtenus sur des prélèvements d'urine effectués en continu, nous remarquons qu'il y a émission d'urine qu'une fois toutes les 3 heures. L'emploi d'un collecteur de fraction relié à l'urinal ne permettra donc pas d'apporter des précisions supplémentaires au niveau de l'élimination urinaire. De ce fait, nous avons préféré abandonner un tel système fragile et délicat à mettre en oeuvre. Nous constatons cependant que l'élimination urinaire débute moins de 3 heures après l'administration orale et est maxima 10 heures 30 après cette administration.

Lors de l'expérimentation, l'élimination urinaire n'est pas terminée trois jours après la dernière administration. Cette élimination apparaît cependant très faible ; nous n'avons en effet recueilli en moyenne que 0,14 p. 100 de la dose administrée. Nous sommes donc amenés à penser que l'acide niflumique est éliminée principalement sous forme de métabolites urinaires, non dosés au cours de cette expérimentation. En effet, les auteurs ayant utilisé des méthodes de dosage faisant appel au  $^{14}\text{C}$ , méthodes permettant de doser la totalité de l'acide niflumique éliminé soit en nature soit sous forme de métabolites, obtiennent des taux de radioactivité urinaire élevé ; ainsi, 30 p. 100 de la dose initiale est éliminée par cette voie en 12 heures chez le rat (14), 40 p. 100 en 48 heures chez l'homme (21).

Dans le cadre du contrôle anti-dopage, le prélèvement d'urine est intéressant, puisqu'il permet de retrouver de l'acide niflumique, à une concentration suffisante, plusieurs jours après son administration. Cependant, la méthode analytique utilisée nécessite une purification, longue et délicate. Cette purification d'ailleurs obligatoire pour le dosage de tous les médicaments acides extraits à pH acide, alourdit les contrôles de routine.

#### II.2.3.1.3. : Élimination fécale :

Nous constatons que cette voie d'élimination permet de retrouver des traces quantifiables d'acide niflumique et n'est donc pas à négliger dans le cadre d'une étude approfondie sur le métabolisme de l'acide niflumique chez le cheval.

Nous avons retrouvé de l'acide niflumique dès le temps 24 heures après la première administration.

#### II.2.3.2. : Application répétée de pommade :

Nous n'avons pas retrouvé des traces quantifiables d'acide niflumique dans le plasma, l'urine et les fèces après administration de Nifluril pommade<sup>o</sup>; or la phénylbutazone administrée à la dose de 500 mg et selon le même protocole, sous forme de phénylarthrite crème<sup>o</sup> pénètre dans l'organisme la concentration plasmatique est de 0,1 ppm 3 heures après l'administration et s'annule en 48 heures. (32).

La formule galénique de la phénylarthrite crème° contient du DMSO, excipient réputé pour son pouvoir pénétrant.

Les laboratoire UPSA nous ont fourni la formule galénique du Nifluril pommade° :

|                                                      |          |
|------------------------------------------------------|----------|
| - acide niflumique .....                             | 3 g      |
| - stéarate de polyéthylène glycol .....              | 15 g     |
| - acide stéanique .....                              | 2 g      |
| - glycérides lauropalmitostéariques polyoxyéthylénés | 5 g      |
| - huile de vaseline .....                            | 6 g      |
| - polyéthylène glycol 400 .....                      | 15 g     |
| - acide sorbique .....                               | 0,065 g  |
| - paraoxybenzoate de méthyl sodé .....               | 0,035 g  |
| - parfum Y II67 .....                                | 0,100 g  |
| - eau purifiée .....                                 | 53,800 g |

Les excipients utilisés dans le Nifluril pommade° ne favorise peut-être pas suffisamment la pénétration de l'acide niflumique dans l'organisme, chez le cheval contrairement à ce que l'on observe pour la Phénylarthrite crème°. Il serait intéressant de vérifier l'activité thérapeutique du Nifluril pommade° sur des chevaux présentant des boiteries.

# CONCLUSIONS

- 64 -

Au cours de ce travail, dans un premier temps, nous avons établi une classification générale des anti-inflammatoires non stéroïdiens, puis nous avons rappelé leur mode d'action, avant de nous intéresser à la pharmacologie de l'acide niflumique, dans différentes espèces animales.

Dans un deuxième temps, expérimental, nous avons étudié, dans le cadre du contrôle anti-dopage, le devenir de l'acide niflumique chez le Cheval. La méthode analytique utilisée permet de déceler une concentration de 10 ppb à partir de 1 ml de plasma, de 5 ppb à partir de 1 ml d'urine. L'acide niflumique a été administré pendant 3 jours consécutifs, selon deux voies :

- par voie orale, il ne peut être décelé dans le plasma que durant 24 heures après la dernière administration ; dans l'urine, il peut être détecté pendant au moins 3 jours après cette dernière administration.
- par voie locale (application de pommade), les taux sanguins et urinaires retrouvés sont inférieurs à la limite de sensibilité de la méthode analytique.

Vu :

LE DIRECTEUR  
de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon,

LE PROFESSEUR RESPONSABLE  
de l'École Nationale Vétérinaire,

Vu :  
LE DOYEN,

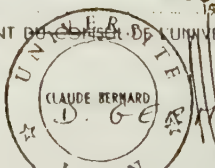
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,

Vu et permis d'imprimer

-5 JUN 1980

LYON, le

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ



LYON I

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - BERGSTROM (S.), DUNCE, VON EULER (U.S.), PERNOW (B.), SJOVALL (J).  
Observation on the effects of infusion of prostaglandin E in man  
Acta physiol. Scand. 1959, 45, 145-151
- 2 - BOISSIER (J.R.), FICHIELLE-PAGNY (J), HORAKOVA (Z.),  
Dérivés phénylaminonicotiniques anti-inflammatoires,  
Thérapie, 1967, 22, 157-168.
- 3 - BOISSIER (J.R.), TILLEMENT (J.P), FROSSARD (C.), FABIANI (P),  
Métabolisme de l'acide niflumique chez le lapin  
Ann. Pharm. Fr. 1968, 26 (II), 707-716.
- 4 - BOISSIER (J.R.), TILLEMENT (J.P.), LAROUSSE (C),  
Métabolisme de l'acide niflumique chez l'homme,  
Thérapie, 1971, 26 (I), 211-218.
- 5 - BONTE (J.R.),  
Les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens,  
Bulletin de la société de pharmacie de Lille,  
1979, 35 (I), 23-64
- 6 - BRES (J.), BRESSOLLE (F.), HUGUET (M.T.),  
Importance de la dissociation ionique des médicaments en pharmacocinétique.  
Méthodes de détermination de leur pka  
Trav. Soc. Pharm. Montpellier 1976, 36 (4), 331-364.
- 7 - COHEN (A.I.), WELIKY (I), LAN (S.J.), LEVINE (S.D.),  
Metabolism of I4 C niflumic acid. Isolation and identification of metabolites from human urine.  
Biomed. Mass. Spectrom. 1974, 1 (I), 1-4.

- 8 - COLLIER (H.O.J.), SWEATMAN (W.J.F.),  
Antagonism by fenamates of prostaglandin  $F_2$  and slow reacting substance  
on human bronchial muscle.  
Nature. 1968, 219, 864-865.
- 9 - COLLIER (J.O.J.), SCHNEIDER (C),  
Nociceptive response to prostaglandins and analgesic actions of aspirine  
and morphine.  
Nature New Biology 1972, 236, 141-143.
- 10 - CUSIMAN (D.W.), CHEUNG (H.S.),  
Effet of substrate concentration on inhibition of prostaglandin synthetase  
of bull seminal vesicles by anti-inflammatory drugs and fenamic acid  
analogs,  
Biochim. Biophys. Acta, 1976, 424 (3), 449-459.
- 11 - DIEBOLD (J.),  
Aspects morphologiques du processus inflammatoire  
Médecine et Maladies infectieuses, 1979, 9 (3 bis), 167-169.
- 12 - FLOWER (R.J.), GRYGLEWSKI (R.), HERBACZYNSKA-CEDRO (K), VANE (J.R.),  
Effets of anti-inflammatory drugs on prostaglandin biosynthesis  
Nature. New Biol. 1972, 238, (82), 104-106.
- 13 - FLOWER (R.J.),  
Drugs which inhibit prostaglandin biosynthesis  
Pharmacol. Rev. 1974, 26, 33-67.
- 14 - GLASSON (B.), BENAKIS (A.), STROLIN-BENEDETTI (M.),  
Distribution, excretion, metabolism and localization of a new anti-  
inflammatory drug niflumic acid labelled with  $^{14}C$   
Biochem. Pharmacol. 1969, 18, 633-643.

- 15 - GLASSON (B.), BENAKIS (A), STROLIN-BENEDETTI (M),  
Elimination biliaire et cycle entérohépatique de l'acide niflumique  
I4 C chez le rat,  
Ann. Pharm. Fr. 1970, 28 (2), 147-152.
- 16 - GODFRAIN (JC), BURGAT-SACAZE (V),  
Les anti-inflammatoires non stéroïdiques.  
Ars. Veterinaria, Galéna. 1975, 39-52.
- 17 - GOUFFAUX (M),  
Les médiateurs chimiques de l'inflammation,  
Ann. Med. Vet. 1976, 120, 307-323.
- 18 - GREAVES (H.W.), SONDERGAAD (J.), MAC DONALD GIBSON (W.),  
Recovery of prostaglandins in human cutaneous inflammation,  
Brit. Med, J., 1971, 2, 258-260.
- 19 - GRYGLEWIKI (R.J.), PANCZENKO (B.), KORBUT (R.), GRODZINSKA (L.),  
OCETKIEWIEZ (A.),  
Corticosteroids inhibit prostaglandin release from perfused mesenteric  
blood vessels of rabbit and from perfused lungs of sensitized guinea-pig.  
Prostaglandins 1975, 10, 343-355.
- 20 - KALEY, WEINER,  
Prostaglandin E I. A potential mediator of the inflammatory response.  
Am. N.Y. Acad. Sc. 1971, 180, 338-350.
- 21 - LAN (S.J.), CHANDO (T.J.), WELIKY (I), SCHREIBER (E.C.),  
Metabolism of niflumic acid I4 C : absorption, excretion and biotrans-  
formation by human and dog.  
J. Pharmacol. Exper. Therapeut. 1973, 186 (2), 323-330.
- 22 - MILLS (R.F.N.), ADAMS (S.S.), CLIFFE (E.E.), DICKINSON (W.) NICHOLSON (J.S)  
The metabolism of ibuprofen  
Xenobiotica, 1973, 3, 589.

- 23 - NIJKAMP (F.P.), FLOWER (R.J.), MONCADA (S.), VANE (J.R.),  
Partial purification of rabbit aorta contracting substance releasing  
factor and inhibition of its activity by anti-inflammatory steroids.  
Nature. 1976, 263, 479-482.
- 24 - PAPPARELLA (V.), QUADRI (E.), COMITE (O.), DE ROGATIS (R.),  
Action of anti-inflammatory agent benzydamine on infections bronchitis  
in chicks.  
Acta Med. Vet. Napoli. 1970, 16, 107-112.
- 25 - PELLETIER (M.), ROCH-ARVEILLER (M.), GIROUD (J.P.),  
Aspects de la réaction inflammatoire ; mécanisme d'ensemble,  
Médecine et maladies infectieuses, 1979, 9, (3 bis), 150-153
- 26 - PLESSAS (C.T.),  
Etude physico-chimique et immunologique des liaisons de l'acide niflumique  
I4 C avec des différentes protéines,  
Chim. Chron. 1972, 1, 175-181.
- 27 - QUADRI (E.), BASSINI (F.),  
Benzydamine in the treatment of bovine endometritis.  
Acta med. vet. Napoli, 1971, 17 (6), 493-498.
- 28 - RAINSFORD (K.D.),  
The comparative gastric ulcerogenic activities of non steroid anti-inflammatory drug  
Agents and actions 1977, 7 (5-6), 573-577.
- 29 - REIGNIER (A.), TOUTAIN (P.L.), RUCKEBUSH (Y.),  
Thérapeutique anti-inflammatoire et ulcères gastriques chez le chien  
Revue Méd. Vét. 1978, 129 (7), 973-981.
- 30 - SHIEA (S.M.), CAULFIELD (J.B.), BURKE (J.F.),  
Microvascular ultrastructure in thermal injury : a reconsideration of the  
role of mediators  
Microvasc. Res. 1973, 5, (1), 87-96.

- 31 - SMITH (M.J.H.),  
Editorial prostaglandins and aspirin : an alternative view  
Agents and Actions 1975, 5, (4), 315-317.
- 32 - TIANO (F.),  
Pharmacocinétique de la phénylbutazone chez le cheval de sport. Application des résultats au contrôle antidopage et à la visite d'achat.  
Thèse Doct. Vét. Lyon 1977.
- 33 - VANE (J.R.),  
Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin like drug.  
Nature New Biol. 1971, 231, 232-235.
- 34 - VANE (J.R.),  
The mode of action of aspirin like drugs  
Agents and Actions 1978, 8, (4), 430-431.
- 35 - VARGAFTIG (B.B.),  
Aspects actuels de la physiopathologie et de la pharmacologie des médiateurs de l'inflammation aiguë.  
Médecine et Maladies infectieuses, 1979, 9 (3 bis), 154-159.
- 36 - YOXALL (A.T.),  
Pain in small animals - its recognition and control.  
J. Small Anim. Pract. 1978, 19, 423-438.



## SOMMAIRE

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION .....                                                      | I  |
| PREMIERE PARTIE : Rappels bibliographiques .....                        | 3  |
| I.1 : Classification des anti-inflammatoires<br>non stéroïdiens .....   | 3  |
| I.2.: Mode d'action des anti-inflammatoires non<br>stéroïdiens .....    | 12 |
| I.3.: Présentation de l'acide niflunique .....                          | 24 |
| DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTALE.....                                    | 36 |
| II.1. : Méthode analytique .....                                        | 37 |
| II.1.1. : Dosage de l'acide niflunique libre<br>dans le plasma .....    | 37 |
| II.1.2. : Dosage de l'acide niflunique dans<br>l'urine .....            | 42 |
| II.1.3. : Dosage de l'acide niflunique dans<br>les fèces .....          | 46 |
| II.2. : Pharmacocinétique de l'acide niflunique<br>chez le cheval ..... | 48 |
| II.2.1. : Protocole expérimental .....                                  | 48 |
| II.2.2. : Résultats .....                                               | 51 |
| II.2.3. : Discussion .....                                              | 60 |
| CONCLUSIONS.                                                            |    |
| BIBLIOGRAPHIE.                                                          |    |





